

Artículo original

TOXICIDAD AGUDA Y RIESGO AMBIENTAL DEL FIPRONIL PARA GUPPY (*POECILIA RETICULATA*)
ACUTE TOXICITY AND ENVIRONMENTAL RISK OF FIPRONIL TO GUPPY (*POECILIA RETICULATA*)

Wilson Gómez-Manrique¹ & Joaquim Gonçalves Machado-Neto²

¹Curso de Maestría en Acuicultura, Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista – CAUNESP, São Paulo, Brasil. Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos - GRITOX, Instituto de Acuicultura, Universidad de los Llanos, Meta, Colombia. ²Departamento de Fitosanidade e Segurança Ocupacional (FCAV/UNESP) Campus de Jaboticabal – São Paulo, Brasil. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884 - 900 Jaboticabal - SP, Brasil. Correo electrónico: wilsongomezmanrique@yahoo.es.

ABSTRACT

The fipronil is an insecticide that has broad-spectrum of action to insect's control. Due the great volume applied in agriculture, it has the possibility of the fipronil to be leached, to suffer to runoff or drift, being able to reach the aquatic way and to provide danger for the aquatic population. To determine the acute toxicity and fipronil environmental risk on guppy (*Poecilia reticulata*) 105 adult fishes were exposed at seven concentrations: 0.00, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, and 0.15 mg·L⁻¹, in aquariums with capacity for 7 L in static system. The exposed fishes to 0.1, 0.125, and 0.15 mg·L⁻¹ had presented happened hyper-excitation symptoms alternated with lethargy and erratic swimming in 12 h first. The mortality after 96 h exposition were of 100.0, 86.6, and 80.0% to 0.15, 0.25 and 0.1 mg·L⁻¹ respectively, and in the concentrations of 0.025, 0.05 and 0.075 mg·L⁻¹, mortality were of 13.3, 20.0, and 33.3%, respectively. The LC_{50-96h} of fipronil for guppy was of 0.08 mg·L⁻¹ classifying it as toxic extremely. The environment concentration estimated (CAS) and the environment risk (RQ) for a 0.3 water column in the recommended dosage highest (400 g ia·ha⁻¹) was of 133.33 and 0.02 mg·L⁻¹, and for 2.0 m was of 1666.63 and 0.25 mg·L⁻¹, classified environmental with adverse effect and adverse possibility effect respectively.

Key words: aquatic environment, central nervous system, insecticide, LC_{50-96h}, phenylpyrazole.

RESUMEN

El fipronil es un insecticida que tiene amplio espectro de acción para el control de insectos. Debido a los grandes volúmenes aplicados en la agricultura, hay posibilidades de que el fipronil sea lixiviado, sufra escorrentía superficial o deriva, pudiendo llegar a los cursos de agua y proporcionar riesgos en la población acuática. Para determinar la toxicidad aguda y el riesgo ambiental del fipronil para el guppy (*Poecilia reticulata*) 105 peces adultos fueron expuestos a siete concentraciones: 0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125 y 0,15 mg·L⁻¹, en acuarios de vidrio con capacidad para 7 L, en sistema estático. Los peces expuestos a 0,1; 0,125 y 0,15 mg·L⁻¹ manifestaron síntomas de hiperexcitación alternados con letargia y nado errático en las primeras 12 h. La mortalidad de los peces después de 96 h de exposición fue de 100; 86,6 y 80% para 0,15; 0,25 y 0,1 mg·L⁻¹ respectivamente, en las concentraciones de 0,025; 0,05 y 0,075 mg·L⁻¹, la mortalidad fue de 13,3; 20 y 33,3% respectivamente. La concentración letal 50 en 96 h (CL_{50-96h}) fue estimada en 0,08 mg·L⁻¹ clasificándolo como extremadamente tóxico para esta especie. Para el riesgo ambiental acuático (CAS) y el cociente de riesgo (CR) se determinó como alto riesgo de intoxicación en una columna de agua de 0,3 m con valores de 133,33 y 0,02 mg·L⁻¹ y de moderado a bajo a los 2,0 m con valores de 1666,63 y 0,25 mg·L⁻¹, siendo aplicado a la dosis de 400 g i.a./ha, según lo recomendado por el fabricante.

Palabras clave: ambiente acuático, CL_{50-96h}, fenilpirazol, insecticida, sistema nervioso central.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de caña de azúcar en Brasil, que data del período colonial (siglo XVI) ha venido representando un segmento importante en la economía de los estados productores de caña de azúcar, particularmente debido al programa de combustible de alcohol conocido como “Pro alcohol”, que fue establecido en 1975 para resolver la dependencia externa de energía. Entretanto, este programa ganó una nueva atención e importancia en los últimos años, como adoptar el uso de un combustible ambiental seguro para los automóviles que están contruidos para funcionar en cualquier proporción de gasolina y alcohol etílico, conocidos como “total flex”.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Geografía y Estadísticas, el área usada en Brasil para la producción de caña de azúcar en el año 2006 fue de 7,04 mill de has, siendo la región Centro-Sur la mayor productora de alcohol con 20.250,174 m³, el estado de São Paulo tuvo una producción de 265,3 mill de tnas en la cosecha de 2006/07, siendo la mayor producción del país con 60% (Ministério da Agricultura 2007).

Entre las tecnologías utilizadas se destaca el uso de insecticidas como el fipronil, usado para el control de insectos dañinos en la caña de azúcar. Se estima que actualmente el fipronil es aplicado en aproximadamente 1,7 mill de has de caña de azúcar para el control del comején, escarabajos y broca de la caña. Además de la caña de azúcar, la aplicación del fipronil es eficaz en bajas dosis para el control de gran variedad de insectos foliares en cultivos de arroz (Balança & De Visscher 1997), verduras y frutas (Zhao et al. 1995, Stevens et al. 1998), siendo utilizado también como terapéutico en veterinaria (Hainzl & Casida 1996).

El alto uso de este insecticida se debe a la alta eficacia en el control de insectos resistentes a los insecticidas piretroides, organofosforados y carbamatos (IBAMA 1987, Bobé et al. 1997). Con ese uso intenso en la agricultura, se espera la presencia de

residuos en la red hidrográfica cercana a las áreas aplicadas.

Existe carencia de informaciones locales sobre los posibles impactos que los agrotóxicos puedan causar en los sistemas acuáticos, pero se sabe que el riesgo de transporte en las áreas de aplicación cercanas a la red hidrográfica pueda resultar en una acción directa sobre organismos no blancos, o indirecta por la alteración de su hábitat o interferencia en la cadena trófica (Nakagome et al. 2007).

En los ambientes acuáticos, los agrotóxicos pueden influenciar en los ciclos normales de vida de los organismos presentes en los cuerpos de agua. En contacto íntimo, los agrotóxicos pueden ser absorbidos y acumulados en los organismos (bioacumulación) ascendiendo así en la cadena trófica. Este acumulo de residuos tóxicos en esta cadena, depende de la disponibilidad y persistencia de los contaminantes en el agua dependiendo principalmente de sus características físicas y químicas.

El guppy, *Poecilia reticulata* fue introducido en el Brasil para el control biológico de mosquitos, aprovechando el comportamiento alimenticio de las larvas (Kohnem 1983). Según, Svobodova & Opperhuizen (1996) esta especie es muy utilizada en estudios de toxicidad debido a su capacidad de adaptación a las condiciones de laboratorio, siendo indicada por la APHA (1998) como organismo para realizar este tipo de estudio.

El objetivo de este trabajo fue estimar el valor de la concentración letal media aguda durante 96 h de exposición (CL_{50-96h}) y clasificar el riesgo ambiental del fipronil para el guppy.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio ecotoxicológico fue realizado de acuerdo con los procedimientos de normas de bioensayos establecidas por la CETESB (1999) – Métodos de Evaluación de la Toxicidad de contaminantes a Organismos

Acuáticos V. I, e IBAMA (1987) - Manual de bioensayos para evaluación de ecotoxicidad de agentes químicos.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecotoxicología de Agrotóxicos y Salud Ocupacional de la Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, Brasil. Se utilizó la formulación comercial Regent 800 WG[®] como fuente de fipronil (5-amino-1-[2,6 - dicloro - 4 - (trifluorometil) fenil] - 4- [(trifluorometil) sulfínil] - 1H - pirazol - 3 - carbonitrilo).

Animales experimentales

En el estudio se utilizaron adultos de guppy (*Poecilia reticulata*) colectados de los tanques de cultivo del Centro de Acuicultura de la UNESP (CAUNESP), localizado en el Campus de Jaboticabal, Brasil. Los ejemplares estaban clínicamente sanos, y fueron criados en estanques en tierra; con peso de $0,42 \pm 0,06$ g para un grupo de 5 peces (Balanza Digital Mark 1300 Class II[®]), alojados en un reservorio revestido con resina epóxica con un volumen de 1000 L de agua. Para el transporte de los ejemplares fueron mantenidos en solución salina al 0,6% con fin de reducir el estrés (Carneiro & Urbinati 2001). El agua de abastecimiento fue de pozo profundo con renovación y aireación constante. La temperatura del agua fue mantenida a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ regulada por un termostato.

Los ejemplares experimentales fueron alimentados dos veces al día (8:00 h y 16:00 h) con alimento concentrado comercial "Poli peixes" de la empresa Polinutre LTDA al 28% de proteína bruta con una ración correspondiente al 2% del peso. Una vez pasado el periodo de aclimatación, fueron transferidos a un reservorio con capacidad para 250 L, ubicada dentro de la sala de bioensayos ecotoxicológicos por un periodo de 7 días antes de ser transferidos para los acuarios definitivos. La temperatura ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$), y fotoperíodo de 12 horas (h) luz y 12 de oscuridad, fueron controlados según las recomendaciones de Murty (1988), usando

aire acondicionado (Consul Air Master 10.000 y temporizador análogo Bivol mod. FX TBA). Fueron medidos los parámetros de calidad del agua: pH (WTW[®] 2A10), conductividad eléctrica (WTW[®] 2C10) y oxígeno disuelto (oxímetro WTW[®] 2B10) a la misma h cada día (14:00 h). El experimento de toxicidad aguda se basó en un sistema estático. La limpieza de los reservorios de aclimatación fue realizada mediante "sifonage", para evitar el acumulo de alimento y heces.

Diseño experimental

CL₅₀ (Concentración letal 50)

Las concentraciones usadas en el experimento para estimar la CL₅₀ del fipronil a las 96 h fue establecida en base a pruebas pilotos y de sensibilidad del guppy, siendo evaluada con dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇), como sustancia referencia para este tipo bioensayos (IBAMA 1987, CETESB 1999).

Determinación de la CL_{50-96h}

El valor de la CL₅₀ se estimó mediante el análisis de mortalidad a las 96 h usando el método Trimmed Spearman-Kärber - TSK versión 1,5 (Hamilton 1977).

Previo al periodo de aclimatación, los ejemplares fueron sometidos a un baño con cloruro de sodio (NaCl) industrial (no yodado) al 1% durante 60 min con el propósito de eliminar ectoparásitos de acuerdo con lo descrito por Francis-Floyd (1995).

En la fase experimental las concentraciones finales utilizadas fueron: 0; 0,025; 0,05; 0,075; 1,0; 0,125 y 0,15 mg·L⁻¹ durante 96 h de exposición en acuarios de vidrio con capacidad para 7 L, conteniendo 5 peces en un volumen de 3 L de agua durante 24 h, y completado para el volumen final con 2 L de agua conteniendo la concentración final de fipronil. Se realizaron tres réplicas, incluyendo un grupo control sin exposición a la sustancia experimental, y se expusieron peces diferentes a los usados en los ensayos piloto y de sensibilidad (n total = 105; n tratamiento = 15). La densidad utilizada fue de un pez por L de

agua sin pasar de 1,0 g por L. Se realizó restricción del alimento 24 h antes y durante el estudio. Los parámetros de calidad de agua fueron monitoreados todos los días a la misma hora (14:00 h). Por medio de la observación directa fue registrado durante 96 h de exposición el comportamiento de los peces, con especial énfasis en la horizontalidad del nado (presente o ausente), patrón de nado (errático o normal), ubicación dentro de la columna de agua y la actitud de los peces (excitación, normal y/o deprimido). La mortalidad en cada uno de los tratamientos fue registrada diariamente con la finalidad de determinar la CL_{50-96h} .

Análisis estadístico

Los resultados de mortalidad se analizaron tomando cada acuario como unidad experimental, expresando la mortalidad en porcentaje para la construcción de los gráficos y como número total de muertos en cada concentración. Los parámetros de la calidad del agua se analizaron mediante el ANOVA, utilizando el paquete estadístico Statistical Analyses System (SAS) v.8.0, siendo expresados como media \pm desviación estándar. Para la construcción de los gráficos y cálculo de los valores de las regresiones lineares también se utilizó el programa estadístico SAS.

Clasificación del riesgo ambiental

Para clasificar la toxicidad aguda y riesgo ambiental del fipronil, fue utilizado el valor de la CL_{50-96h} . El fipronil fue clasificado por la clase de toxicidad citada por Helfrich et al. (1996) (Tabla 1), y el método de cociente (Q) y riesgo ambiental según Urban & Cook (1986), siendo: ningún efecto adverso ($Q < 0,1$), posibilidad de efecto adverso ($0,1 < Q < 10$) y probabilidad de efecto adverso ($Q > 10$). El Q fue calculado por la división de la concentración ambiental estimada (CAE) entre el valor de la CL_{50-96h} .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el periodo de exposición las variables de temperatura (23 ± 1 °C), pH ($7,81 \pm 0,1$), conductividad eléctrica ($181,5 \pm 1,71$ μ S/cm) y oxígeno disuelto ($8,11 \pm 0,09$ mg·L⁻¹) del agua no mostraron variaciones significativas entre tratamientos durante el periodo de aclimatación ni durante la fase experimental.

Durante las primeras 24 h de exposición, los peces expuestos a 0,1, 0,125 y 0,15 mg·L⁻¹ de fipronil, manifestaron síntomas de hiperexcitación, alternados con letargia y nado errático, sin tener ubicación fija en la columna de agua.

Tabla 1. Clases de toxicidad de agrotóxicos para peces según Helfrich et al. (1996).

Clases de toxicidad	CL_{50-96h} (mg·L ⁻¹)
Supertóxico	< 0,01
Extremamente tóxico	0,01 a 0,10
Altamente tóxico	0,11 a 1,0
Moderadamente tóxico	1,1 a 10
Ligeramente tóxico	11 a 100
Mínimamente no tóxico	> 100

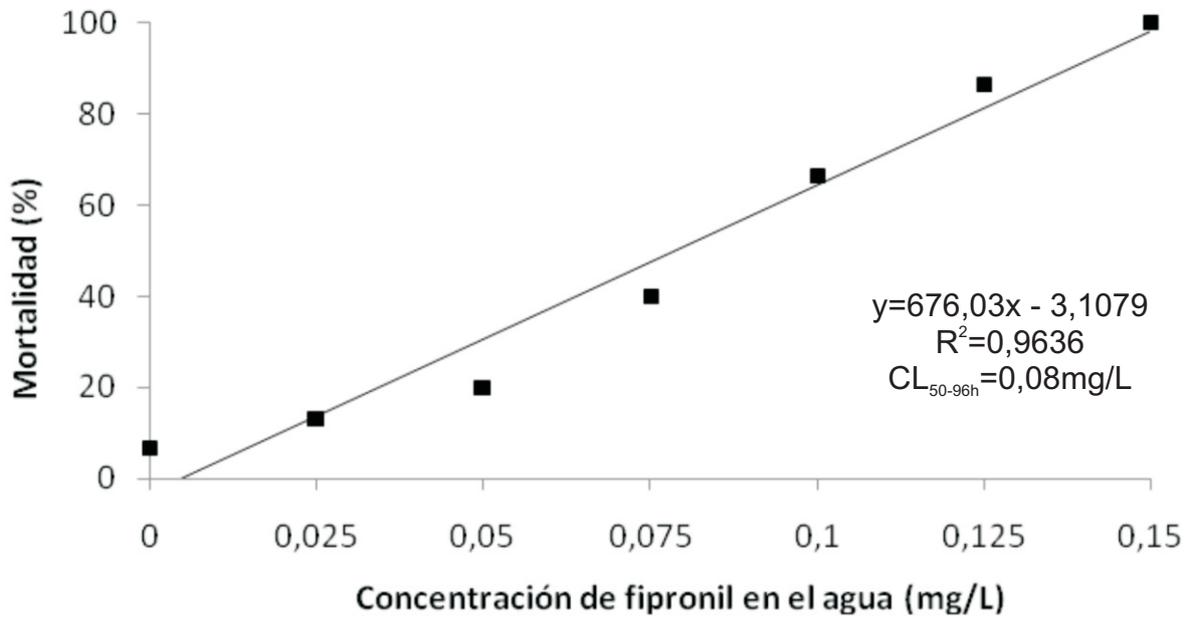


Figura 1. Representación gráfica de la mortalidad (%) de guppy *P. reticulata* en función de la concentración de fipronil.

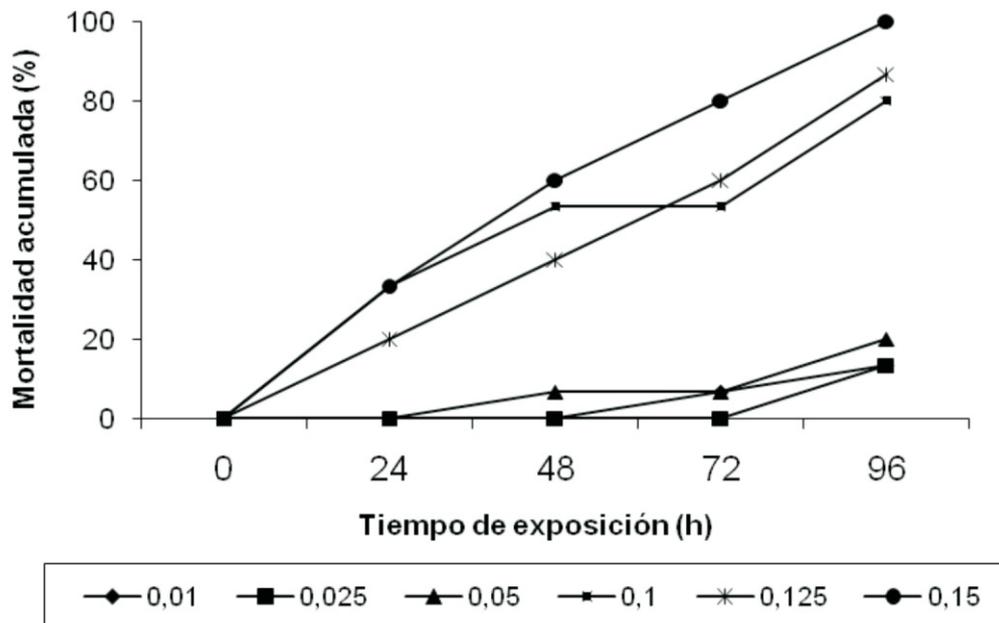


Figura 2. Mortalidad acumulada de guppy *P. reticulata* expuestos durante 96 h al fipronil.

La mortalidad de los peces después de 96 h de exposición al fipronil fue de: 80; 86,6 y 100% para las concentraciones de 0,1; 0,125; 0,150 mg·L⁻¹ respectivamente, donde se observó mayor actividad de movimiento en los peces. En las concentraciones de 0,025; 0,050 y 0,075 mg·L⁻¹ la mortalidad fue de 13,3; 20 y 33,3 respectivamente (Fig. 1). Los primeros cambios de comportamiento en estas últimas concentraciones fueron observadas a partir de 12 h de someterlos a la exposición al producto, siendo cada vez más notable en la medida que aumentaban las concentraciones y el tiempo. Durante el experimento la mortalidad del grupo control (0 mg·L⁻¹) no superó el 10%. La CL_{50-96h} del fipronil para el guppy, fue de 0,08 mg·L⁻¹ (0,07 – 0,1; Intervalo de Confianza al 95%), clasificándolo como extremadamente tóxico para esta especie.

En la Fig. 1 están representados los porcentajes de mortalidad obtenidos en función de las concentraciones de fipronil a la que los ejemplares fueron expuestos para la obtención de la estimativa de la CL₅₀ a las 96 h. En cuanto al riesgo de intoxicación ambiental, el fipronil se clasifica con posibilidad de efecto adverso en las dosis decrecientes de 100 hasta

6,25% (0,1 Q 10) para 0,30 m de columna de agua, este valor fue debido al alto valor de la CL_{50-96h} calculado (Tabla 2), expresando alta toxicidad del insecticida para esta especie. El valor de la CL_{50-96h} estimada fue muy inferior a la CAE del fipronil considerando la dosis (%) más alta recomendada por el fabricante (400 g i.a ha).

Para la profundidad de 2,0 m el insecticida fue clasificado entre las dosis decrecientes de 100 y 50% con posibilidad de riesgo. En esta profundidad el riesgo ambiental del fipronil no presenta ningún efecto adverso para esta especie. Por tanto, en la columna de agua de 0,30 m proporciona mayor riesgo de intoxicación suficiente para provocar mortalidad a la población de guppy. Debido al comportamiento del guppy de mantenerse en la superficie del agua para captar el oxígeno y alimento, esta especie puede ser afectada indirectamente, alterando su ciclo biológico dentro del ecosistema.

Como el fipronil no está registrado para uso en la acuicultura Brasileira, los valores de la CAE fueron calculados en base a la mayor dosis recomendada para uso agrícola según el fabricante (Boock & Machado-Neto 2000).

Tabla 2. Concentración ambiental estimada (CAE) para las diferentes columnas de agua en función de la contaminación (Porcentajes decrecientes de la mayor dosis recomendada, 400 g i.a·ha⁻¹), Cociente de riesgo (RQ) y clases de riesgo para guppy *P. reticulata*.

Columna de agua de 0,30 m de profundidad				Columna de agua de 2,0 m de profundidad			
Dosis (%)	CAE (mg·L ⁻¹)	RQ	Riesgo	Dosis (%)	CAE (mg·L ⁻¹)	RQ	Riesgo
100	0,133	1,66	b	100	0,02	0,25	b
50	0,066	0,83	b	50	0,01	0,125	b
25	0,033	0,41	b	25	0,005	0,0625	a
12,5	0,016	0,20	b	12,5	0,0025	0,0312	a
6,25	0,008	0,10	b	6,25	0,00125	0,0156	a
3,125	0,004	0,05	a	3,125	0,00063	0,00781	a
1,56	0,002	0,025	a	1,56	0,00032	0,00393	a

a: Ningún efecto adverso; b: Posibilidad de efecto adverso.

Para el cálculo de la CAE fueron considerados los siguientes criterios: La densidad media del agua de $1,0 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, el producto distribuido uniformemente en el espejo de agua de un reservorio de 1,0 ha con 0,3 y 2,0 m de profundidad. La justificación para considerar la profundidad de 0,3 m es la presencia de zooplankton y fitoplancton, siendo estos las bases de la cadena trófica acuática. La profundidad de 2,0 m es la recomendada por la EPA para evaluar el riesgo en ambientes acuáticos (Solomon 1996).

Las CAEs del fipronil en las camadas de agua, fueron calculadas considerando la disponibilidad para los organismos acuáticos de las siguientes proporciones: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 y 1,56% de la mayor dosis recomendada por el fabricante para el uso agrícola ($400 \text{ g ia}\cdot\text{ha}^{-1}$) (AGROFIT 2007).

Masutti & Mermut (2007), determinaron en suelos de "trapiche" en la industria caña de azúcar en la región de Sirinhaém, Pernambuco (Brasil) que la adsorción del fipronil y sus derivados en el suelo están determinados por la cantidad de cristales de hidróxido de hierro y carbono, pudiendo ser más lenta la degradación, haciendo que el acumulo sea mayor y tenga más facilidad de llegar al ecosistema acuático que se encuentran cerca de las áreas agrícolas donde usan este producto.

La alta toxicidad del fipronil para esta especie se debe al mecanismo de acción específico del insecticida, actuando directamente en el sistema nervioso central (SNC), inhibiendo el impulso nervioso normal por competencia con el neurotransmisor ácido gamma aminobutírico (GABA), bloqueando la compuerta de entrada de los canales de cloro de las neuronas, resultando en una actividad neural excesiva (Kidd & James 1991). Este aumento de actividad neural produce parálisis y consecuentemente la muerte (Bobé et al. 1998).

Scholz et al. (2006), observaron que los efectos del fipronil en el desarrollo de embriones y larvas de *Danio rerio* expuestos a $0,033 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ produce disminución en la

respuesta motora, deterioro en la morfología en las fibras musculares y degeneración en la notocorda, pudiendo llegar a provocar la muerte.

Es así como el fipronil en ambientes acuáticos puede llegar a especies más sensibles al fipronil que el guppy como se demostró en la *Daphnia pulex* (Stark & Vargas 2005) cuya CL_{50-96h} calculada fue de $0,016 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para el guppy, el fipronil es 168 veces más tóxico que para la trucha arcoíris cuya CL_{50-96h} es de $0,248 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Urban & Cook 1986). En el caso de la contaminación de los ecosistemas acuáticos con fipronil, partiendo del uso de la dosis máxima recomendada en las áreas agrícolas, puede causar desequilibrio en el ciclo biológico normal así como en la cadena trófica. De esta forma, el uso agrícola del fipronil debe ser restricto a las áreas alejadas de los cuerpos de agua, para evitar la contaminación por posible lixiviación o por deriva.

La CL_{50-96h} fue estimada en $0,08 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ clasificándolo como extremadamente tóxico para esta especie. Para el riesgo ambiental acuático se determinó en alto riesgo de intoxicación para la columna de agua de 0,3 m de profundidad y de moderado a bajo en la de 2,0 m aplicándolo en la máxima dosis recomendada por el fabricante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT. (Sistema de Agrotóxicos Fitosanitarios). 2007. *Regent 800 WG. Relatório de Produtos Formulados*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília. 3 p.
- APHA – American Public Health Association; AWWA – American Water Works Association; WPCF. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed. Washington DC. 1085 p.
- Balança, G. & De Visscher, M. 1997. Impacts on non-target insects of a new insecticide compound used against the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk. 1775).

- Arch. Environ. Contam. Toxicol., 32: 58–62.
- Bobé, A.; Cooper, J.F. & Coste, C.M. 1997. Factors influencing the adsorption of fipronil on soils. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 4861-4865.
- Bobé, A.; Cooper, J.F.; Coste, C.M. & Marie-Anne, M. 1998. Behavior of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. *Pestic. Sci.*, 52:275-281.
- Boock, M.V. & Machado-Neto, J.G. 2000. Estudos toxicológicos do oxicloreto de cobre para tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.). *Arq. Inst. Biol.* São Paulo, 67:215-221.
- Carneiro, P.C.F. & Urbinati, E.C. 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquacult. Research*, 32:297-304.
- CETESB. 1999. *Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos.* volume I. São Paulo. p. 1-61.
- Colliot, F.; Kukorowski, K.A.; Hawkins, D.W. & Roberts, D.A. 1992. *Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide.* In: Proceedings of Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases 11:29–34.
- Conelly, P. 2001. *Environmental fate of fipronil.* Environmental Monitoring Branch. Department of Pesticide Regulation. California Environmental Protection Agency. Sacramento, CA 95812-4015, p. 3.
- Francis-Floyd, R. 1995. *The use of salt in aquaculture.* Fact Sheet VM 86. Series of the Department of Large Animal Clinical Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. [Acesso el 18 de junio, 2008]. URL: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/VM/VM00700.pdf>
- Hainzl, D. & Casida, J.E. 1996. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93:12764–12767.
- Hamilton, M.A.; Russo, R.C. & Thurston, V. 1977. Trimmed Spearman – Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 7:714–719.
- Helfrich, L.A.; Weigmann, D.I.; Hipkins, P. & Stinson, E.R. 1996. *Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems.* p24. [Acesso el 12 de abril, 2008]. URL: <http://www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.pdf>.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). 1987. *Avaliação da toxicidade aguda para peixes.* In: Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília. p.20-32.
- Kidd, H. & James, D. 1991. *The Agrochemicals Handbook*, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK. 1991.
- Kohnem, U.P. 1983. *O Guppy – Criação e desenvolvimento.* 2 ed. São Paulo. Edi. Nobel. p. 78.
- Masutti, C.S.M. & Mermut, A.R. 2007. Sorption of fipronil and its sulfide derivative by soils and goethite. *Geoderma*, 140:1-7.
- Ministério da Agricultura. 2007. *Pecuária e Abastecimento.* Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da Cana-de-açúcar e Agroenergia. Março – [Acesso en junio, 2008]. URL: <http://www.seplan.go.gov.br/energias/dow/apresentacoes/%C3%A1cool%20e%20a%C3%A7%C3%BAcar%20no%20brasil%20-%20mapa.pdf>.
- Murty, A.S. 1988. *Toxicity of pesticide to fish.* CRC Press. v.2. 165 p.
- Nakagome, F.K.; Noldin, J.Á. & Resgalla, J.R.C. 2007. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*.

- Pesticidas: Rev. Ecotoxicol. e Meio Amb. (Curitiba), 16:93–100.
- Rand, G.M. & Petrocelli, S.R. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation. Washington. 665 p.
- Scholz, N.I.; Stehr, C.M.; Linbo, T.I. & Incardona, J.P. 2006. The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. *Toxicol. Sci.*, 92:270-278.
- Solomon, K.R. 1996. *Avaliação de riscos ecotoxicológicos dos produtos fitossanitários*. Relatório técnico. Centro de Toxicologia. Universidade de Guelph, Canadá. 52p.
- Stark, J.D & Vargas, R.I. 2005. Toxicity and hazard assesment of fipronil to *Daphnia pulex*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 62:11-16.
- SAS (Statistical Analyses System). v.8. *User's guide: Statistics*. Cary: 842 p.
- Stevens, M.M.; Helliwell, S. & Warren, G.N. 1998. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. *Field. Crops. Res.*, 57:195–207.
- Svobodova. Z. & Opperhuizen, A. 1996. Bioaccumulation and body burden of four triorganotin compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57:146-154.
- Urban, D.J. & Cook, N.J. 1986. *Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure Ecological risk assessment*. Washington. USEPA Publication. p.96.
- Zhao, J.Z.; Wu, S.C. & Zhu, G.R. 1995. Bioassays with recommended field concentrations of several insecticides for resistance monitoring in *Plutella xylostella*. *Resistant Pest. Mgmt.*, 7:13–14.
- Fecha de recepción: 15 de agosto del 2008.
Fecha de aceptación: 13 de septiembre del 2008.