
DETERMINAÇÃO DO BIOPESTICIDA AZADIRACHTIN PRESENTE EM AMOSTRAS DE PEIXES E EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE TANQUES DE CRIAÇÃO DE PEIXES, EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Manoel Lima de Menezes¹

Andreli Cristina Dalbeto¹

Claudinei Cruz²

Joaquim Machado Gonçalves Neto²

¹ Universidade
Estadual Paulista –
UNESP, Faculdade de
Ciências,
Departamento de
Química, SP.

² Universidade
Estadual Paulista –
UNESP, Faculdade de
Ciências Agrárias e
Veterinárias, SP.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação do biopesticida azadirachtin presentes em amostras de peixes e em amostras de água de tanques de criação de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. *Salusvita*, v. 23, n. 3, p. 387-399, 2004.

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico para a determinação do azadirachtin, presente em amostras de peixes e em água de tanques de criação destes. O emprego da coluna cromatográfica ISRP-C₁₈ (250 mm x 2 mm DI), (Internal Surface Reverse Phase), permitiu a injeção direta dos extratos de peixes e água dos tanques de criação, sem tratamento prévio da amostra. As recuperações do azadirachtin adicionadas previamente em amostras de peixes, empregando o metanol como solvente de extração, foram maiores que 90%, com desvio padrão inferiores a 14,6%. A aplicação do método foi avaliada efetuando-se a determinação do azadirachtin em 42 amostras de peixes previamente tratados com o extrato vegetal de *Azadirachta indica*, obtendo valores entre 0,14 a 1,03 µg.g⁻¹ de peixe.

PALAVRAS-CHAVE: CLAE; Azadirachtin; peixes; biopesticidas

Recebido em: 12/03/2004.
Aceito em: 20/10/2004.

INTRODUÇÃO

O azadirachtin é extraído da planta *Azadirachta indica* que pertence à família Meliaceae. Esta família apresenta diversas espécies de árvores conhecidas pela madeira de grande utilidade, como mogno, cedro, santa-bárbara ou cinamomo, cedrilho, canje-rana, etc. É originário do Sudeste da Ásia e é cultivado em diversos países da Ásia, em todos os países da África, na Austrália, América do Sul e Central. É usado há séculos na Ásia, principalmente na Índia, como planta medicinal. Tem diversos usos, em especial anti-séptico, curativo ou vermífugo; é também utilizado no preparo de sabões medicinais, cremes e pastas dentais. A árvore é usada para sombra e possui madeira de qualidade para a produção de móveis, construções, batentes e portas, caixas e caixotes, lenha, carvão, etc.

Seu uso como inseticida se tornou bem conhecido nos últimos 30 anos, quando seu principal composto, o azadirachtin, foi isolado. Os inseticidas naturais da árvore *Azadirachta indica* são biodegradáveis, portanto não deixam resíduos tóxicos nem contaminam o ambiente. Possuem ação repelente, antialimentar, reguladora de crescimento e inseticida, além de acaricida, fungicida e nematicida. Por sua natureza, os extratos da *Azadirachta indica* são mundialmente aprovados para uso em cultivos orgânicos.

CONSIDERAÇÕES SOBRE A ANÁLISE DO AZADIRACHTIN

Os diversos métodos analíticos relatados na literatura especializada apresentam a determinação do Azadirachtin, presentes em várias amostras de vegetais, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (SCHAAF et al., 2000; SUNDARAM; CURRY, 1993).

Sundaram e Curry (1993) efetuaram a determinação do Azadirachtin presentes em extrato da planta *Azadirachta indica*, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (SUNDARAM; CURRY 1993). O Azadirachtin foi extraído das matrizes sólidas, empregando metanol aquoso, seguido pela re-extração com hexano e diclorometano. Após evaporação do diclorometano, o resíduo foi dissolvido com acetato de etila, purificado em uma micro-coluna de florisil e determinado em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, equipado com uma coluna cromatográfica C₁₈ e um detector de absorção na região do ultra-

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação do biopesticida azadirachtin presentes em amostras de peixes e em amostras de água de tanques de criação de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 387-399, 2004.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação do biopesticida azadirachtin presentes em amostras de peixes e em amostras de água de tanques de criação de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 207-219, 2004.

violeta, empregando um gradiente de água e acetonitrila, como fase móvel (SUNDARAM et al., 1995).

Schaaf et al. desenvolveram um método analítico, rápido e sensível para a determinação do Azadirachtin e triterpenóides presentes na *Azadirachta indica*, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a um espectrômetro de massa. O método apresentou um limite de detecção de 1,0 mgL⁻¹ (SCHAAF et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico, para efetuar a determinação do Azadirachtin, presentes em amostras de águas de viveiros, empregado na criação e em tecidos de peixes, empregando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, equipado com uma coluna cromatográfica ISRP-C₁₈ – HSA, sem tratamento prévio das amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

A acetonitrila foi obtida da Carlo Erba (Milan, Italy); o padrão de azadirachtin foi adquirido da Aldrich – Sigma (Milwaukee, USA); o fosfato monobásico de sódio foi adquirido da Merck (E. Merck, Darmstadt, Germany). A água deionizada foi fornecida a partir de um sistema de purificação Milli-Q, obtido da Millipore (Millipore, Bedford, MA).

Amostra de peixe

Foram coletadas 42 amostras de peixes, 6 amostras controle junto aos viveiros, empregados na criação dos peixes no campus da Unesp de Jaboticabal. Estas amostras foram mantidas sob refrigeração (-8°C) até o momento da análise.

Amostras de água

Foram coletadas 6 amostras de água com concentrações que variaram de 40,0 a 240,0 mgL⁻¹. Estas amostras foram mantidas sob refrigeração (-8°C) até o momento da análise.

Instrumentação

Os experimentos cromatográficos foram realizados em um Sistema Isocrático de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE, da marca VARIAN, equipado com uma bomba recíproca, modelo 2510; um detector ultravioleta com comprimento de onda variável, modelo 2550, com comprimento de onda ajustado em 217 nm e um integrador da marca Spectra-Physics, modelo SP 4400 cho-majet, adquirido da Varian Associates, Inc. (Sunnyvale, CA, USA). Os extratos digeridos e as soluções-padrão foram injetadas em uma coluna ISRP-C₁₈ (250 mm x 2 mm DI), com uma válvula manual de injeção (Rheodyne 7125, Cotati, CA, USA) ligada a um “alça” de 500 µL.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação do biopesticida azadirachtin presentes em amostras de peixes e em amostras de água de tanques de criação de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 387-399, 2004.

Condições Cromatográficas

A coluna cromatográfica ISRP-C₁₈ (250 mm x 2 mm DI) empregada foi preparada conforme Menezes e Félix (1998). A determinação do azadirachtin foi realizada em temperatura ambiente, com fluxo de fase móvel ajustado em 0,5 mL.minuto⁻¹. A fase móvel empregada foi composta por uma mistura de solução aquosa de fosfato monobásico de sódio 0,05 mol.L⁻¹ e acetonitrila (63: 37 v/v).

Preparação da curva analítica

As soluções padrões de azadirachtin, contendo concentrações que variaram de 15,0 a 60,0 µg.L⁻¹, foram utilizadas para construção da curva analítica. Estas foram preparadas efetuando-se a diluição de uma solução padrão de azadirachtin 50x10⁵ µg.L⁻¹ preparada previamente, dissolvendo-se 0,005 g de azadirachtin em 10,0 mL de metanol. Esta solução foi diluída 100 vezes em metanol, obtendo uma solução, uma concentração final de 50 x 10³ µg.L⁻¹ de azadirachtin.

MENEZES, Manoel
Lima de et al.
Determinação do
biopesticida
azadirachtin
presentes em
amostras de peixes e
em amostras de água
de tanques de criação
de peixes,
empregando
cromatografia líquida
de alta eficiência.
Salusvita,
Bauru, v. 23, n. 3,
p. 207-219, 2004.

Avaliação do tempo de recuperação do azadirachtin em amostra de peixe, empregando metanol

Pesaram-se três amostras de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, inteiras com aproximadamente 2,0 g, seguida pela maceração com almofariz e pistilo, até obter uma massa homogênea. A estas foram adicionadas 50 µL de uma solução contendo $50 \times 10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$ de azadirachtin. O macerado foi transferido para um frasco e a este adicionado 10mL de metanol, obtendo-se uma concentração final de $250 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os frascos foram submetidos à agitação com auxílio de uma mesa agitadora por 30, 60 e 90 minutos. Após o término do tempo pré-determinado as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 6000 rpm. Foram injetados 500 µL da solução sobrenadante, no sistema CLAE.

Avaliação da recuperação do azadirachtin

Pesaram-se três amostras de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, inteiras com aproximadamente 2,0 g, seguida pela maceração com almofariz e pistilo, até obter uma massa homogênea. A estas foram adicionadas 40, 60 e 80 µL de uma solução contendo $50 \times 10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$ de azadirachtin. O macerado foi transferido para um frasco e a este adicionado 10 mL de metanol, obtendo-se concentrações de 200,0; 300,0 e 400,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os frascos foram submetidos à agitação com o auxílio de uma mesa agitadora por 90 minutos. Após o término do tempo pré-determinado as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 6000 rpm. Estas amostras foram diluídas 1:10 da solução sobrenadante e injetados 500 µL, no sistema CLAE.

Determinação do azadirachtin na água empregada nos tanques de criação de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Foram coletadas amostras de água em seis tanques, cujas concentrações de azadirachtin variam 40,0 a 240,0 mg.L^{-1} . Estas amostras foram previamente diluídas, na proporção 1:10, com o objetivo de eliminar picos interferentes de possíveis metabólitos presentes

nas amostras. Assim, injetou-se 500 µL das amostras no sistema CLAE.

Determinação do azadirachtin em amostras de peixe

As amostras de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, foram previamente pesados e submetidos à maceração com almofariz e pistilo, até obter uma massa homogênea. O macerado foi transferido para um frasco e a este adicionado 10,0 mL de metanol. Os frascos foram submetidos à agitação, por 90 minutos. Após este processo, as mostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos. Ao término da centrifugação injetou-se 500 µL do extrato diluído 1:10 no sistema CLAE.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação do biopesticida azadirachtin presentes em amostras de peixes e em amostras de água de tanques de criação de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 387-399, 2004.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Emprego da coluna ISRP-C₁₈ na determinação do azadirachtin

Várias técnicas de extração empregando extrações, líquido:líquido, soxlet, cromatografia líquida pressurizada (PLE; DIONEX-ASE[®]) para acelerar a extração com solventes, têm sido utilizadas para extrair diversos compostos de tecidos de peixes. No entanto, essas técnicas de extração não são somente caras, mas também diminuem a seletividade. Compostos interferentes de tecidos biológicos, semelhantes aos lipídeos, incluindo o colesterol, são co-extraídos. Portanto, após a extração, a separação do analito de interesse de proteínas e lipídeos interferentes requer mais tempo que o processo de extração do próprio composto de interesse (OSEM-WENGIE; STEINBERGH, 2003).

No desenvolvimento deste projeto de pesquisa avalia-se o emprego da coluna cromatográfica ISRP-C₁₈-HSA, (*internal surface reverse phase*), para efetuar a separação e a determinação do biopesticida azadirachtin presente em tecidos de peixes.

A FIGURA 1 apresenta os cromatogramas da solução padrão de azadirachtin: (A) 60 µgL⁻¹, (B) cromatograma obtido após injeção de 500 µL da amostra controle e (C) cromatograma obtido após injeção de 500 µL de uma amostra real de peixe.

MENEZES, Manoel
Lima de et al.
Determinação do
biopesticida
azadirachtin
presentes em
amostras de peixes e
em amostras de água
de tanques de criação
de peixes,
empregando
cromatografia líquida
de alta eficiência.
Salusvita,
Bauru, v. 23, n. 3,
p. 207-219, 2004.

No cromatograma C, observou-se que o azadirachtin foi separado dos metabólitos, não havendo sobreposição de picos interferentes.

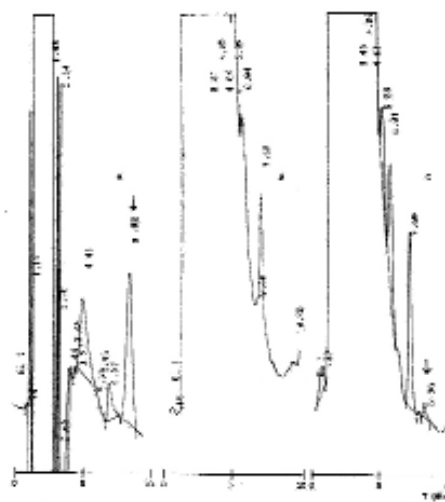


FIGURA 1 – Cromatogramas obtidos após as injeções de: 500 μL de uma solução-padrão contendo $250 \mu\text{gL}^{-1}$ de azadirachtin (cromatograma A), 500 μL da amostra controle (cromatograma B) e 500 μL do extrato de uma amostra real de peixe (cromatograma C).

Avaliação do tempo de extração empregando o metanol como solvente

Tem sido estimado que mais de 100 estruturas relatadas de triterpenóides foram isoladas de várias partes da árvore *Azadirachta indica*. O azadirachtin é o mais oxigenado e o mais polar destes triterpenóides já isolados desta planta (JOHNSON et al., 1996). Considerando-se esta propriedade físico-química, avaliou-se o emprego do metanol como solvente de extração. De acordo com os resultados apresentados na TABELA 1, constatou-se que em 90 minutos de agitação obteve-se uma extração de 81,5% do analito de interesse.

TABELA 1 – Determinação do tempo de recuperação da amostra.

Tempo (minuto)	Recuperação (%)	DPR (%)
30	27,7	3,25
60	58,7	1,22
90	81,5	1,26

Avaliação da recuperação do azadirachtin em tecidos de peixes

O método empregado para a avaliação do azadirachtin na análise dos tecidos de peixes, apresentou bons resultados. Isto se deve aos limites de detecção e quantificação, bem quanto aos valores de recuperação adequados (TABELA 2) mostrando que a presença de proteínas, contidas nos extratos, não interferiu na recuperação do azadirachtin.

TABELA 2 – Avaliação da recuperação de azadirachtin em tecido de peixe.

Nível de fortificação (lg L-1)	Recuperação (%)	DPR (%)
0,20	90,0	14,6
0,30	95,5	7,2
0,40	98,4	14,4

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação do biopesticida azadirachtin presentes em amostras de peixes e em amostras de água de tanques de criação de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 387-399, 2004.

APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Determinação do azadirachtin em amostras de peixes

Uma vez otimizado o método analítico proposto, foram efetuadas as determinações dos níveis de azadirachtin em amostras de peixe. Os resultados foram obtidos empregando-se uma curva analítica, cuja equação da reta é $y = -953,64 + 95468,3x$ com um coeficiente linear empregado de r^2 igual a 0,99877.

De acordo com os resultados obtidos apresentados na TABELA 3, observa-se que em 86% das amostras de peixes analisados, foram determinados níveis de azadirachtin que variaram de 0,14 a 1,03 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peixe.

Nas demais amostras analisadas (14%) não foram detectadas frações de azadirachtin.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação do biopesticida azadirachtin presentes em amostras de peixes e em amostras de água de tanques de criação de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 207-219, 2004.

TABELA 3 – Determinação do azadirachtin em amostras reais de peixe.

Número da amostra	Massa do peixe (g)	Concentrações de azadirachtin ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	2,12	ND
2	2,577	0,36
3	1,688	0,50
4	2,17	ND
5	1,70	1,03
6	3,024	0,19
7	2,55	0,20
8	1,465	0,27
9	1,62	0,21
10	1,78	0,20
11	1,871	ND
12	2,278	0,25
13	2,663	0,19
14	2,317	0,22
15	2,663	0,15
16	1,058	0,47
17	1,506	0,21
18	2,309	ND
19	2,042	0,28
20	2,108	ND
21	2,435	0,30
22	2,720	0,21
23	2,882	0,23
24	1,829	0,22
25	1,986	0,22
26	2,246	0,25
27	2,176	0,37
28	2,313	0,50
29	2,712	0,14
30	3,492	0,48
31	2,255	0,20
32	2,406	0,53
33	2,055	0,38
34	1,712	0,49
35	2,296	0,44
36	2,155	0,62
37	2,690	ND
38	2,158	ND
39	2,317	ND
40	2,696	0,18
41	2,663	ND
42	2,014	ND

Determinação de azadirachtin em amostras de água dos tanques de criação de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O emprego da coluna cromatográfica ISRP-C₁₈ permitiu a injeção direta de 500 µL da amostra real de água dos tanques viveiros da criação dos peixes, requerendo apenas a diluição da mesma, para a determinação do azadirachtin. Os resultados obtidos são apresentados na TABELA 4.

Cabe ressaltar que os resultados obtidos foram determinados após 24 horas do tratamento com o azadirachtin, em que foi adicionado o biopesticida para obter concentrações de 40,0; 80,0; 120,0; 180,0; 200,0 e 240,0x10³ µg L⁻¹.

Observando-se os resultados da TABELA 4, verifica-se os níveis de concentrações de azadirachtin, após 24 horas de adição bem abaixo das concentrações adicionadas. Pode-se inferir que parte da concentração foi absorvida pelos peixes e parte do mesmo sofre degradação, de acordo com as informações relatadas por Sundaram et al. (1995).

TABELA 4 – Determinação de azadirachtin em amostras reais de água de viveiros de criação.

Numero da amostra	Concentração de azadirachtin adicionada 103(µg L ⁻¹)	Concentração de azadirachtin após 24 horas (µg L ⁻¹)
1	40	0,11
2	80	0,43
3	120	1,09
4	160	0,51
5	200	1,86
6	240	2,73

CONCLUSÃO

O método desenvolvido é simples, rápido e a coluna ISRP-C₁₈ pode ser utilizada para determinar as concentrações do biopesticida azadirachtin, presente em amostras de peixes e água de tanques de criação.

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação do biopesticida azadirachtin presentes em amostras de peixes e em amostras de água de tanques de criação de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 387-399, 2004.

MENEZES, Manoel
Lima de et al.
Determinação do
biopesticida
azadirachtin
presentes em
amostras de peixes e
em amostras de água
de tanques de criação
de peixes,
empregando
cromatografia líquida
de alta eficiência.
Salusvita,
Bauru, v. 23, n. 3,
p. 207-219, 2004.

É importante enfatizar que o emprego do metanol como solvente de extração, mostrou-se muito eficiente para efetuar as extrações do azadirachtin de tecidos de peixes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP, à Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Bauru e de Jaboticabal pela ajuda financeira e ao Instituto de Saúde dos Trabalhadores do Município de Bauru pelo uso da infraestrutura dos laboratórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, R.; HAYTON, W. L. Gas chromatographic determination of parathion e paraoxon in fish plasma and tissues. *J. Analyt. Toxicol*, v. 20, p. 151-154, 1996.
- ABDALLAH, P. R. BACHA, C. J. C. Evolução da atividade pesqueira no Brasil: 1960-1994. O agropecuário brasileiro: Desafios e Perspectivas. In: AGUIAR, D. R. D.; PINHO, J. B. *Anais*. 1998. p. 387-399.
- ANAZAWA, A. T. *Preparação, caracterização, e avaliação de diferentes fases estacionarias reversas, Tipo C8 para CLAE*. Tese (Doutorado)-Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, 1996.
- ANNINO, J. *Química Clínica – Princípios e Métodos*. São Paulo: Manole, 1978.
- BEGUM, G. et al. Study of dimeothoate bioaccumulation in liver and tissues of *Clarias batrachus* and its elimination following cessation of exposure. *Pestic. Sci.*, v. 40, p. 201-205, 1994.
- BERGWERFF, A. A.; KUIPER, R. V.; SCHERPENISSE, P. Persistence of residues of malaquite green in juvenile eels (*Anguila anguila*). *Aquaculture*, 2004. In press.
- BIDLINGEMEYER, B. A. *Practical HPLC methodology and applications*. New York: Willey-Interscience publication, 1992.
- BRANSON, D. R. et al. *Trans. Am. Fisheries Soc*, v. 4, p. 785, 1975.
- CONTRERAS-GUZMAN, E. S. *Bioquímica de pescados e derivados*. Jaboticabal: Editora FUNEP, 1994. 409 p.
- DAWSON, V. K. et al. A simple analytical procedure to replace HPLC for monitoring treatment concentrations of chloramine-T on fish cultures facilities. *Aquaculture*, v. 217, p. 61-72, 2003.
- GALLAGHER, G. L. *Aquaculture Magazine Buye's Guide'99 and Industry Directory*. 28 Edition annual, N.C.: 7[Aquaculture Magazine], 1999. 304 p. 28802, USA.

GONÇALVES, M. S. M. Composição em nutrientes e caracterização das proteínas do filé do pacu (*Colossoma mitrei*, Berg). Dissertação (Mestrado)-UNICAMP/FEA, Campinas, 1989.

HAUG, T.; HALS, P. A. Pharmacokinetics of oxitetracycline of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in freshwater at low temperature. *Aquaculture*, v. 186, p. 175-191, 2000.

HERNANDEZ, F. et al. Automated sample clean-up procedure for organophosphorus pesticides in several aquatic organisms using normal phase liquid chromatography. *Analy. Chim. Acta*, v. 374, p. 215-229, 1998.

INGELSE, B. A. et al. Determination of polar organophosphorus pesticides in aqueous sample by direct injection using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromat. A.*, v. 918, p. 67-78, 2001.

JOHNSON, S., MORGAN, D. E., PEIRIS, C. N. Development of the Major Triterpenoids and Oil in the Fruit and Seeds of Neem (*Azadirachta indica*). *Annals of Botany*, v. 78, p. 383-388, 1996.

MARTINS, M. L. et al. Parasitic infections in cultured freshwater fishes. A survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. *Rev. Bras. Parasit.*, v. 9, n. 1, 2000.

MARTINS, M. L., SOUZA, V. N. MORAES, F. R. Infecção por *Myxobolus* sp (Myxozoa, Myxobolidae) em alevinos de tambacús oriundos de piscicultura comercial. *Ars. Vet.*, v. 14, n. 3, p. 324-330, 1998.

MENEZES, M. L.; FÉLIX, G., On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparathion and pentachlorophenol pesticides from crude milk by direct injection into HPLC on bovine serum albumin stationary phase. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, v. 21, n. 18, p. 2863-2871, 1998.

OSEMWENGIE, L. I.; STEINBERG, S. Closed-loop stripping analysis of synthetic musk compounds from fish tissues with measurement by gas chromatography; mass spectrometry with selectec-ion monitoring., *Journal of Chromatography A.*, v. 993, p. 1-15, 2003.

PAVANELLI, G. C., ERIAS, J. C. TAKEMOTO, R. M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Maringá: Ed. da UEM, 1998. 294 p.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil plantanus*, from the estuarine region of Cananéia. *Res. Bras. Zool.*, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 329-339, 1997.

ROBERTS, R. J.; BULLOCK, A. M. The skin surface ecosystem of teleost fishes. *Proc. Royal Soc. Edimb.*, v. 79, p. 87-91, 1980.

RODRIGUES, E. L. et al. Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus acrofa*. *CEPTA*, Pirassununga, p. 197-203, 1997.

SAINT-PAUL, U. Potencial for aquaculture for South American fish: a review. *Aquaculture*, v. 54. p. 205-240, 1986.

SCHAAF, O. et al. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid

MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação do biopesticida azadirachtin presentes em amostras de peixes e em amostras de água de tanques de criação de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 387-399, 2004.

- MENEZES, Manoel Lima de et al. Determinação do biopesticida azadirachtin presentes em amostras de peixes e em amostras de água de tanques de criação de peixes, empregando cromatografia líquida de alta eficiência. *Salusvita*, Bauru, v. 23, n. 3, p. 207-219, 2004.
- chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromat.A*, v. 886, p. 89-97, 2000.
- SENHORIN, J. A. et al. Larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus holmberg*, (Pisces Characidae) em viveiros com e sem organofosforados (folidol 60%). CEPTA, Pirassununga, n. 2, p. 197-201, 1993.
- SHERMA, J.; BERBOSA, M. *Manual os Analytical Quality Control For Pesticides And Related Compounds, In Human And Environmental Samples*. U.S.: Environmental Protection Agency, 1982.
- SILVA, A. J. *Aspectos da alimentação do pacu adulto, Colossoma Mitrei Berg, 1985 (Pisces, Characidae) no pantanal de Mato Grosso*. Dissertação (Mestrado em Zoologia)–UFRJ, Rio de Janeiro, 1985, p. 92.
- SUNDARAM, K. M. S., CURRY, J. High performance liquid chromatographic determination of azadirachtin in conifer and deduous foliage, forest soils, leaf litter and stream water. *J. Liq. Chromatogr*, 1993.
- SUNDARAM, K. M. S.; SLOANE, L.; CURRY, J. Kinetics of azadirachtin hydrolysis in model aquatic systems by high-performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 28, p. 363-376, 1995.
- TAKINO, M. DAISHIMA, S. NAKAHARA, T. Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J. Chromat. A.*, v. 1011, p. 67-75, 2003.
- TAVARES-DIAS, M. *Estudos parasitológicos e hematológicos em peixes oriundos de “pesque-pagues” do município de Franca, São Paulo*. Dissertação (Mestrado)-CAUNESP, 2000, 130 p.
- VALENTI, W. C. *Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília: CNPq/ Ministérios da Ciência e Tecnologia, 2000, 399 p.

