

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

MÁRJORI BRENDA LEITE MARQUES

**BIOINDICADORES DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS PELO
INSETICIDA CLORPIRIFÓS**

Ilha Solteira
2019

MÁRJORI BRENDA LEITE MARQUES

**BIOINDICADORES DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS
PELO INSETICIDA CLORPIRIFÓS**

Defesa apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil.

Área de Conhecimento: Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais

Prof^a Dra. Juliana Heloisa Pinê Américo Pinheiro

Orientadora

Prof. Dr. Claudinei da Cruz

Co-orientador

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Marques, Márjori Brenda.

M357b Bioindicadores de ambientes aquáticos contaminados pelo inseticida clorpiifós / Márjori Brenda Marques. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2019
74 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia. Área de conhecimento: Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais, 2019

Orientador: Juliana Heloisa Pinê Américo Pinheiro

Co-orientador: Claudinei Da Cruz

Inclui bibliografia

1. Recursos hídricos. 2. Ecotoxicologia aquática. 3. Organismos bioindicadores. 4. Ambientes contaminados. 5. Agrotóxicos. 6. Inseticida clorpirifós.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Bioindicadores de ambientes aquáticos contaminados pelo inseticida clorpirifós

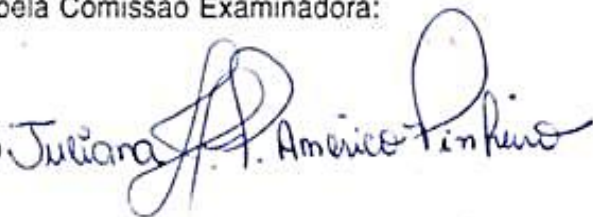
AUTORA: MÁRJORI BRENDA LEITE MARQUES

ORIENTADORA: JULIANA HELOISA PINE AMERICO PINHEIRO

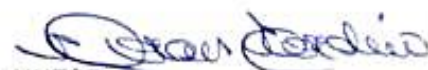
COORDINADOR: CLAUDINEI DA CRUZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ENGENHARIA CIVIL, área: Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais pela Comissão Examinadora:

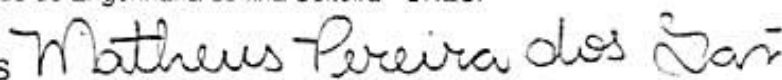
Profa. Dra. JULIANA HELOISA PINE AMERICO PINHEIRO
Ciências Ambientais / Universidade Brasil



Profa. Dra. MARIA ANGELA DE MORAES CORDEIRO
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP



Prof. Dr. MATHEUS PEREIRA DOS SANTOS
Produção Animal, Instituto de Zootecnia / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ



Ilha Solteira, 06 de dezembro de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho à Deus e seus seres iluminados que me ajudaram nesta jornada. A minha família que tanto amo e aos meus amigos queridos. A todos os pesquisadores, estudantes e professores que lutam pela pesquisa e educação no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela benção concedida tendo o privilégio e a oportunidade de estudar e pesquisar.

À minha família amada que sempre me apoiou me ajudando em todos os momentos e escolhas da minha vida.

Ao Departamento de Engenharia Civil e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais da Unesp de Ilha Solteira.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Dra. Juliana Heloisa Pinê Américo Pinheiro por ter me escolhido como orientada e por ter me guiado numa importante linha de pesquisa ambiental.

Ao professor Dr. Claudinei da Cruz que me aceitou como co-orientada, me proporcionando uma maravilhosa experiência laboratorial.

À toda equipe do Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia de Agrotóxicos (LEEA), que tão pacientemente me ensinaram e ajudaram na minha pesquisa.

À todos os meus amigos que amo tanto, em especial as meninas da Turma X de biologia e as meninas da República Tcheca da Unesp de Ilha Solteira.

À Jairene que tão bem me acolheu em sua pensão.

As cidades de Ilha Solteira e Barretos que me proporcionaram momentos maravilhosos durante minha pesquisa e vivência.

RESUMO

O clorpirifós (O,O-dietil-O-3,5,6-tricloropiridin-2-piridinilfosforotioato), é um inseticida da classe dos organofosforados detectado em ambientes aquáticos e responsável por causar danos ao sistema nervoso dos animais. Objetivou-se avaliar a toxicidade aguda do inseticida clorpirifós para organismos de diferentes níveis tróficos: *Lemna minor*, *Azolla caroliniana* e *Wolffia brasiliensis* (produtores), *Pomacea canaliculata* e *Macrobrachium acanthurus* (consumidores primários), *Xiphophorus maculatus* e *Hyphessobrycon eques* (consumidores secundários). O trabalho buscou mensurar as variáveis de qualidade de água: pH, temperatura, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido durante os ensaios, e verificar quais das espécies testadas pode ser o melhor bioindicador de contaminação de ambientes aquáticos para clorpirifós. Os ensaios agudos foram realizados de acordo com os procedimentos do Guideline for testing of chemicals – *Lemna minor* Growth Inhibition da OECD, adaptado para as macrófitas, e ABNT NBR 15088: 2016 para peixes, adaptado para caramujo e camarão. Os valores das concentrações de efeito, de inibição e letal estimadas (CE50, CI50 e CL50) foram calculadas pelo software *Trimmed Spearman Karber*. O clorpirifós foi considerado como praticamente não tóxico para as macrófitas *Lemna minor*, *Azolla caroliniana* e *Wolffia brasiliensis*, apresentando respectivamente a CI50 de 1299,6, 849,74 e 1271,63 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Para o caramujo *P. canaliculata*, o clorpirifós foi considerado como pouco tóxico, apresentando CE50 de 30,90 mg. L⁻¹ de clorpirifós. A CL50 para os peixes *Xiphophorus maculatus* e *Hyphessobrycon eques* respectivamente foi de 0,07 e 1,65 mg. L⁻¹ de clorpirifós, classificando-o como extremamente tóxico e moderadamente tóxico. Para *M. acanthurus*, a CL50 apresentada foi de 0,002 mg. L⁻¹ de clorpirifós, classificando o produto como extremamente tóxico. O valor estimado da toxicidade do clorpirifós para o *M. acanthurus*, está abaixo da concentração máxima permitida de clorpirifós nos padrões de qualidade de água para consumo humano (0,030 mg. L⁻¹ de clorpirifós). Assim, o camarão *M. acanthurus* é melhor bioindicador de contaminação de ambientes aquáticos por clorpirifós. Ressalta-se a importância de haver limites para esse agrotóxico na Resolução CONAMA 357/2005 que sejam abaixo da concentração considerada tóxica para o camarão, visando à proteção das comunidades aquáticas.

Palavras chaves: Organofosforados. Camarão. Macrófitas. Peixes. Toxicidade.

ABSTRACT

Chlorpyrifos (O, O-diethyl-O-3,5,6 trichloropyridin-2-pyridinylphosphorothioate), is an insecticide of the class of organophosphates detected in aquatic environments and responsible for causing damage to the nervous system of animals. The objective was to evaluate the acute toxicity of the insecticide chlorpyrifos to organisms of different trophic levels: *Lemna minor*, *Azolla caroliniana* and *Wolffia brasiliensis* (producers), *Pomacea canaliculata* and *Macrobrachium acanthurus* (primary consumers), *Xiphophorus maculatus* and *Hyphessobrycon eques* (secondary consumers). The work sought to measure the variables of water quality: pH, temperature, electrical conductivity and dissolved oxygen during the tests, and to verify which of the species tested may be the best bioindicator of contamination of aquatic environments for chlorpyrifos. The acute tests were carried out according to the procedures of the OECD Guideline for testing of chemicals - *Lemna minor* Growth Inhibition, adapted for macrophytes, and ABNT NBR 15088: 2016 for fish, adapted for snails and shrimp. The estimated effect, inhibition and lethal concentration values (EC50, CI50 and CL50) were calculated using the Trimmed Spearman Karber software. Chlorpyrifos was considered practically non-toxic to the macrophytes *Lemna minor*, *Azolla caroliniana* and *Wolffia brasiliensis*, respectively showing the IC50 of 1.299,6, 849,74 and 1271,63 mg. L⁻¹ of chlorpyrifos. For the snail *P. canaliculata*, chlorpyrifos was considered to be low toxic, with EC50 of 30,90 mg. L⁻¹ of chlorpyrifos. The LC50 for *Xiphophorus maculatus* and *Hyphessobrycon eques*, respectively, was 0,07 and 1,65 mg. L⁻¹ of chlorpyrifos, classifying it as extremely toxic and moderately toxic. For *M. acanthurus*, the LC50 presented was 0,002 mg. L⁻¹ of chlorpyrifos, classifying the product as extremely toxic. The estimated value of the toxicity of chlorpyrifos to *M. acanthurus*, is below the maximum permitted concentration of chlorpyrifos in water quality standards for human consumption (0,030 mg. L⁻¹ of chlorpyrifos). Thus, the shrimp *M. acanthurus* is the best bioindicator of contamination of aquatic environments by chlorpyrifos. The importance of having limits for this pesticide in CONAMA Resolution 357/2005 that are below the concentration considered toxic for shrimp, in order to protect aquatic communities, is emphasized.

Keywords: Organophosphorus. Shrimp. Macrophytes. Fish. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura geral dos organofosforados.....	20
Figura 2	- Via de entrada dos agrotóxicos no meio ambiente aquático e mobilização a partir do solo.....	22
Figura 3	- Estrutura molecular do clorpirifós.....	24
Figura 4	- Aspectos do cultivo e do ensaio de toxicidade com <i>Lemna minor</i> . A) Frondes de <i>Lemna minor</i> ; B) Recipiente com <i>Lemna minor</i> durante aclimação; C) Ensaio com <i>Lemna minor</i> em triplicata.....	40
Figura 5	- Aspectos do cultivo e do ensaio de toxicidade com <i>Azolla caroliniana</i> . A) Frondes de <i>Azolla caroliniana</i> ; B) Recipiente com <i>Azolla caroliniana</i> durante aclimação; C) Ensaio com <i>Azolla caroliniana</i> em triplicata.....	41
Figura 6	- Aspectos do cultivo e do ensaio de toxicidade com <i>Wolffia brasiliensis</i> . A) Frondes de <i>Wolffia brasiliensis</i> durante aclimação; C) Ensaio com <i>Wolffia brasiliensis</i> em triplicata.....	42
Figura 7	- A) Caramujos <i>Pomacea canaliculata</i> adultos; B) Ovos de <i>Pomacea canaliculata</i> ; C) Recipientes teste com réplicas contendo caramujos por concentração do inseticida clorpirifós.....	44
Figura 8	- A) Camarão <i>Macrobrachium acanthurus</i> ; B) Recipientes teste com réplicas contendo o camarão por concentração do inseticida clorpirifós.....	46
Figura 9	- A) Espécie adulta de <i>Xiphophorus maculatus</i> ; B) Alevinos de <i>Xiphophorus maculatus</i> expostos ao clorpirifós; C) Recipientes teste com réplicas contendo <i>Xiphophorus maculatus</i> por concentração do inseticida.....	48
Figura 10	- A) Alevinos de <i>Hyphessobrycon eques</i> ; B) Aclimação de <i>Hyphessobrycon eques</i> ; C) Recipientes teste com réplicas contendo <i>Hyphessobrycon eques</i> por concentração do clorpirifós.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Características gerais e propriedades físico-químicas do inseticida clorpirifós.....	24
Quadro 2	- Valores das concentrações de inibição com cloreto de sódio como substância de referência para macrófitas.....	39
Quadro 3	- Parâmetros de qualidade de água para o caramujo <i>Pomacea canaliculata</i>	54
Quadro 4	- Parâmetros de qualidade de água para o camarão Pitú (<i>Macrobrachium acanthutus</i>).....	56
Quadro 5	- Parâmetro de qualidade de água para o peixe Platy (<i>Xiphophorus maculatus</i>).....	59
Quadro 6	- Parâmetros de qualidade de água para o peixe Mato-grosso (<i>Hyphessobrycon eques</i>).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Categorias para classificação ecotoxicológica dos valores de concentração letal 50% (CI/CL/CE50) para organismos não-alvos.....	50
Tabela 2	- Concentração de inibição estimada (CI50) do inseticida clorpirifós para as macrófitas (<i>Lemna minor</i> , <i>Azolla caroliniana</i> e <i>Wolffia brasiliensis</i>).....	51
Tabela 3	- Concentração de efeito estimada (CE50) do inseticida clorpirifós para o caramujo (<i>Pomacea canaliculata</i>).....	53
Tabela 4	- Concentração letal estimada (CL50) do inseticida clorpirifós para o camarão Pitú (<i>Macrobrachium acanthurus</i>).....	55
Tabela 5	- Concentração letal estimada (CL50) do inseticida clorpirifós para os peixes Platy e Mato-grosso (<i>Xiphophorus maculatus</i> e <i>Hyphessobrycon eques</i>).....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	16
3	OBJETIVOS.....	17
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
4.1	AGROTÓXICOS: DEFINIÇÃO E ASPECTOS LEGAIS.....	18
4.2	O USO DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS NA PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA.....	19
4.3	A ROTA DOS AGROTÓXICOS NO MEIO AMBIENTE.....	21
4.4	AÇÃO DOS ORGANOFOSFORADOS NOS SERES VIVOS.....	22
4.5	CLORPIRIFÓS: UM ORGANOFOSFORADO COM ÁTOMOS DE CLORO.....	24
4.6	CLORPIRIFÓS NA NATUREZA.....	25
4.7	PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA.....	27
4.8	ORGANISMOS BIOINDICADORES.....	29
4.9	EFEITOS DE CLORPIRIFÓS EM ORGANISMOS BIOINDICADORES...	31
4.10	ORGANISMOS AQUÁTICOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	34
4.11	MACRÓFITAS (<i>LEMNA MINOR</i> , <i>AZOLLA CAROLINIANA</i> E <i>WOLFFIA</i> <i>BRASILIENSIS</i>).....	34
4.12	CARAMUJO (<i>POMACEA CANALICULATA</i>).....	35
4.13	CAMARÃO PITÚ (<i>MACROBRACHIUM ACANTHURUS</i>).....	35
4.14	PEIXES PLATY E MATO-GROSSO (<i>XIPHOPHORUS MACULATUS</i> E <i>HYPHESSOBRYCON EQUES</i>).....	36
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1	LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS.....	37
5.2	INSETICIDA UTILIZADO.....	38
5.3	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM ORGANISMOS NÃO- ALVOS.....	38

5.3.1	Ensaio de toxidade com macrófitas (<i>Lemna minor</i> , <i>Azolla caroliniana</i> e <i>Wolffia brasiliensis</i>).....	38
5.3.2	Ensaio de toxidade com caramujo (<i>Pomacea canaliculata</i>).....	43
5.3.3	Ensaio de toxidade com camarão Pitú (<i>Macrobrachium acanthurus</i>).....	45
5.3.4	Ensaio de toxidade com os peixes Platy e Mato-grosso (<i>Xiphophorus maculatus</i> e <i>Hyphessobrycon eques</i>).....	46
5.4	CLASSIFICAÇÃO DOS INSETICIDAS PELA TOXICIDADE AGUDA.....	50
5.5	ANÁLISE DOS DADOS.....	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
6.1	TOXICIDADE AGUDA DO INSETICIDA PARA AS MACRÓFITAS (<i>LEMNA MINOR</i> , <i>AZOLLA CAROLINIANA</i> E <i>WOLFFIA BRASILIENSIS</i>)	50
6.2	TOXIDADE AGUDA DO INSETICIDA PARA O CARAMUJO (<i>POMACEA CANALICULATA</i>).....	53
6.3	TOXIDADE AGUDA DO INSETICIDA PARA O CAMARÃO PITÚ (<i>MACROBRACHIUM ACANTHURUS</i>).....	55
6.4	TOXIDADE AGUDA DO INSETICIDA PARA OS PEIXES PLATY E MATO-GROSSO (<i>XIPHOPHORUS MACULATUS</i> E <i>HYPHESSOBRYCON EQUES</i>).....	57
6.5	CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE CLORPIRIFÓS EM ÁGUA DOCE E OS VALORES DE CI, CE E CL50 PARA OS BIOINDICADORES.....	60
7	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são substâncias químicas que estão divididas em diferentes classes, tais como herbicidas, inseticidas, acaricidas, fungicidas e nematicidas. Estes produtos possuem como ingredientes ativos compostos químicos formulados para prevenir, combater ou destruir espécies indesejáveis e doenças que possam interferir na produção, no processamento, armazenamento, transporte de alimentos, produtos agropecuários, madeira e seus derivados (MELO *et al.*, 2010; VASCONCELOS, 2018).

Dentre as diversas justificativas para a utilização dos agrotóxicos em larga escala na agricultura brasileira, está a facilidade de aplicação, o custo operacional menor do que outras técnicas de controle, eficácia biológica diferencial e acesso facilitado ao sistema de compra. Outro ponto importante é o fator ambiental como clima tropical e altas temperaturas, pois a maioria das regiões agrícolas, não possui períodos de invernos rigorosos para interromper o ciclo de reprodução das pragas, patógenos e fungos, como ocorre em países de clima temperado (MELO *et al.*, 2010; VASCONCELOS, 2018).

Dentre os produtos utilizados como inseticidas, os compostos organofosforados (OP's) foram e ainda são importantes para as atividades agrícolas em todo o mundo, constituindo uma família muito diversificada de produtos químicos orgânicos. Os OP's foram banidos da agricultura na União Europeia e nos Estados Unidos devido sua alta toxicidade e por serem inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), no entanto, seu uso ainda é permitido no Brasil. (BARBOZA, 2018). A AChE é uma enzima que vem sendo testada como biomarcador da presença de agrotóxicos (CHEREMISINOFF; KING, 1994; SILVA, 2014).

O clorpirifós (O,O-dietil-O-3,5,6-tricloropiridin-2-piridinilfosforotioato) é um agrotóxico da classe dos inseticidas pertencente ao grupo dos OP's. Devido ao seu uso generalizado e sua persistência no meio ambiente, os OP's continuam sendo detectados em vários compartimentos ambientais, especialmente em ecossistemas aquáticos (BARNHOORN *et al.*, 2005; NAIGAGA *et al.*, 2011; FLASKOS, 2012; OGBEIDE *et al.*, 2016).

Em corpos de água doce, o clorpirifós tem uma meia-vida de 16 a 77 dias de acordo com as condições ambientais. A presença de clorpirifós em riachos e lagos tem ganhado grande interesse científico, devido seus efeitos tóxicos sobre

organismos aquáticos que são capazes de acumular o inseticida, provocando alterações nos aspectos comportamentais, neurológicos e reprodutivos (DE-SILVA; SAMAYAWARDHENA, 2005; ORUÇ, 2010; BOTTÉE *et al.*, 2012).

Muitos organismos são sensíveis a distúrbios nos ecossistemas, podendo ser utilizados para indicar fatores estressantes causados por ações antrópicas. Estes organismos são denominados bioindicadores, pois possuem relação a elementos abióticos tornando-se altamente sensíveis as perturbações humanas (ARIAS *et al.*, 2007). O uso de diversos bioindicadores abrangendo diferentes níveis de organização biológica possibilita o conhecimento sobre a que nível o contaminante interage com o organismo, e a que nível este é mais suscetível à ação do poluente (BAGLIANO, 2012).

Utilizar organismos como indicadores biológicos para a identificação de danos antrópicos causados nos ecossistemas é essencial para um monitoramento completo acerca da qualidade da água. As espécies mais frequentes nos corpos hídricos são as que mais contribuem para a manutenção e avaliação da integridade ecológica (SILVA-DE-SÁ *et al.*, 2019).

Os bioindicadores aquáticos utilizados neste trabalho: macrófitas (produtores), caramujo e camarão (consumidores primários) e os peixes (consumidores secundários), são espécies de diferentes níveis tróficos presentes no interior do estado de São Paulo. As macrófitas apresentarem elevadas taxas de crescimento e reprodução (KISS; KOVÁTS; SZALAY, 2003). O caramujo assim como toda espécie invasora, possui potencial para competir com espécies nativas por recursos limitados (GHESQUIERE, 2005). O camarão apresenta alta fecundidade, bastante adequada para fins comerciais (VALENTI; MELLO; LOBÃO, 1989).

Objetivou-se avaliar a toxicidade aguda do inseticida clorpirifós para organismos de diferentes níveis tróficos: *Lemna minor*, *Azolla caroliniana* e *Wolffia brasiliensis* (produtores), *Pomacea canaliculata* e *Macrobrachium acanthurus* (consumidores primários), *Xiphophorus maculatus* e *Hyphessobrycon eques* (consumidores secundários). O trabalho buscou mensurar as variáveis de qualidade de água: pH, temperatura, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido durante os ensaios, e verificar quais das espécies testadas pode ser o melhor bioindicador de contaminação de ambientes aquáticos para clorpirifós.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O Brasil aparece em 44^o posição em um ranking da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) sobre uso de defensivos agrícolas. Segundo os dados da entidade, o consumo relativo no país foi de 4,31 quilos de defensivos por hectare cultivado em 2016. Em 2019, 42 defensivos agrícolas foram registrados, desse total, apenas um produto traz um ingrediente ativo novo (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO- DOU, 2019; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA, 2019a).

O clorpirifós é um inseticida do grupo dos organofosforados utilizado em culturas como café, tomate, citrus, milho, soja, algodão, trigo e pastagens (OUROFINOAGRO, 2018). O principal mecanismo de ação dos organofosforados é inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) ocasionando a morte do organismo (CHEREMISINOFF; KING, 1994).

O clorpirifós não está na lista de concentrações máximas permitidas de agrotóxicos para as cinco classes de águas doces da Resolução CONAMA nº 357 de 2005. O limite de concentração permitida do inseticida é mencionado apenas nos parâmetros para água de consumo humano na Portaria de Consolidação nº 5 de 2017 do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; BRASIL, 2005).

Os organismos aquáticos são espécies não-alvos que acabam sofrendo as mesmas consequências que as pragas de lavoura, por apresentarem o sistema nervoso semelhante aos dos artrópodes. Espécies bioindicadoras são organismos extremamente sensíveis a perturbações por possuírem contato direto com os fatores abióticos. Utilizar bioindicadores de diferentes níveis tróficos possibilita o conhecimento sobre a que nível o contaminante interage com o organismo, e a que nível este é mais suscetível à ação do poluente. Torna-se assim essenciais para elaborar estratégias eficazes que permitam recuperar a biodiversidade de ecossistemas perturbados (ARIAS *et al.*, 2007).

Portanto, espera-se que ao realizar testes de toxicidade com bioindicadores de diferentes níveis tróficos, utilizando um agrotóxico não mencionado na Resolução CONAMA 357/2005, torne esta pesquisa de grande valia para a legislação brasileira rever os padrões exigidos acerca da qualidade de águas doces, e quais as consequências causadas pelo clorpirifós em organismos aquáticos não-alvos.

3 OBJETIVOS

i) Determinar a toxicidade aguda (CI50), e a classificação ecotoxicológica do inseticida clorpirifós para as macrófitas aquáticas *Lemna minor*, *Azolla caroliniana* e *Wolffia brasiliensis*.

ii) Determinar a toxicidade aguda (CE50), e a classificação ecotoxicológica do inseticida para o caramujo *Pomacea canaliculata*.

iii) Determinar a toxicidade aguda (CL50), e a classificação ecotoxicológica do inseticida para o camarão *Macrobrachium acanthurus*.

iv) Determinar a toxicidade aguda (CL50), e a classificação ecotoxicológica do inseticida para os peixes *Xiphophorus maculatus* e *Hyphessobrycon eques*.

v) Mensurar as variáveis de qualidade de água: potencial hidrogeniônico, temperatura, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido durante os ensaios.

vi) Verificar quais das espécies não alvos testadas pode ser considerada como o melhor bioindicador de contaminação de ambientes aquáticos por clorpirifós.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 AGROTÓXICOS: DEFINIÇÃO E ASPECTOS LEGAIS

O Brasil está entre os maiores produtores agropecuários do mundo e o segundo país que mais exporta esses produtos, desempenhando um importante papel na economia local. As extensas áreas de plantio e o clima com altas temperaturas, proporcionou que o Brasil fosse um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo. Para manter a produção, este setor utiliza de sementes transgênicas e insumos químicos, como agrotóxicos. (PIGNATI *et al.*, 2017).

A palavra “agrotóxico” é o termo legal definido pela Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, também conhecida como “Lei dos agrotóxicos”. Segundo a lei, são considerados agrotóxicos e afins os produtos químicos utilizados nos setores agrícolas capazes de alteração a composição da fauna e flora, preservando-as da ação danosa dos seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

No entanto, os termos pesticidas, praguicidas e defensivos agrícolas também são utilizados. A palavra está associada ao setor que a emprega, por exemplo, as empresas que comercializam agrotóxicos preferem utilizar o termo “defensivos agrícolas”, pois na visão deles os produtos são utilizados com o objetivo de proteger a produção agrícola (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA, 2018a).

Por meio do inciso IX, Artigo 1º do Decreto Federal nº 6.099/2007, foi delegada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) ligado ao Ministério do Meio Ambiente, a competência para realizar a análise, registro e controle de agrotóxicos, seus componentes e afins. No setor do meio ambiente, o IBAMA estabelece quais são os critérios necessários a serem tomados no uso de agrotóxicos, por meio das características e comportamento de cada produto e suas consequências em diferentes compartimentos ambientais (BRASIL, 2007; INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS- IBAMA, 2016).

Em junho de 2019, o Diário Oficial da União (DOU), publicou sobre o ato nº 42 que traz o registro de 42 agrotóxicos, sendo apenas um com ingrediente ativo novo. Da lista, 29 dos produtos possuem ingredientes ativos já autorizados no Brasil, o restante são produtos genéricos com ação inseticida (DOU, 2019; MAPA, 2019b).

A justificativa para a liberação dos novos produtos estaria na diminuição dos custos de produção e preço dos agrotóxicos aumentando a concorrência no mercado. Nos últimos três anos, medidas desburocratizantes foram implementadas nos três órgãos, aumentando a velocidade no registro de novos agrotóxicos (MAPA, 2019b).

A história do desenvolvimento agropecuário no Brasil é marcada por momentos de grande imprudência e catástrofes ambientais pelo uso inadequado de agrotóxicos. No entanto, a agricultura sustentável em larga escala ainda é vista como um desafio para o Brasil, mesmo com a descoberta de produtos menos agressivos, avanços na redução e fabricação de inseticidas e com o manejo integrado de pragas e doenças de lavouras (CARVALHO; PIVOTO, 2011).

As plantas daninhas, insetos, fungos, bactérias e roedores, resultam em danos às lavouras. Estes fatores adversos são os responsáveis para o empobrecimento da qualidade dos alimentos, que por consequência refletirá no aumento de preço, aumentando também na dependência de alimentos importados. O armazenamento de grandes estoques de grãos pode encontrar-se impróprios ao consumo, caso não ocorra o controle com agrotóxicos, evitando danos desde a colheita até a estocagem (GODOY; OLIVEIRA, 2004).

Os agrotóxicos possuem diversas classes agronômicas de acordo com sua função: inseticidas (controlar insetos), acaricidas (ácaros), nematicidas (nematóides), fungicidas (fungos), herbicidas (plantas daninhas), reguladores de crescimento, rodenticidas (roedores) (ANVISA, 2018a; BARBOZA, 2018).

4.2 O USO DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS NA PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA

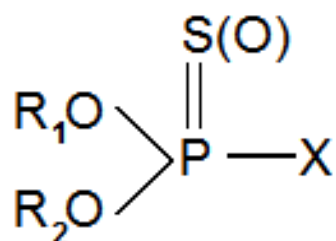
Em meados da década de 1944, devido ao aumento da produção agrícola influenciada pela Segunda Guerra Mundial, os organofosforados (OP's), surgiram como um meio de substituição para os organoclorados, que até então possuíam maior toxicidade, tendo o Paration como principal representante. Por apresentar elevada eficácia e devido sua baixa persistência ambiental, os OP's correspondem a 34% das vendas mundiais para o controle de insetos em residências e na produção agrícola (SHAPIRO *et al.*, 2016, ALFONSO *et al.*; 2017,).

Os OP's, são um grupo de compostos químicos utilizados na agropecuária. Seu uso pode levar a intoxicações acidentais em animais e humanos. Dentre os diversos

efeitos causados pelos Op's, sua principal característica tóxica é a causa de insuficiência cardiorrespiratória por comprometimento do sistema nervoso autônomo (CAVALIERE, 1996).

Os OP's são ésteres de ácido fosfórico e seus derivados. A estrutura química geral de um organofosforado (Figura 1) se resume a um átomo central de fósforo (P) e ligações características que envolvem um grupo fosforila (P = O), ou um grupo tiofosforila (P = S) ou um grupo selenofosforila (P=Se) (ELERŠEK; FILIPI, 2011).

Figura 1- Estrutura geral dos Organofosforados



Fonte: Eleršek e Filipi (2011).

Os Op's apresentam um largo campo de aplicações, pois sua estrutura química permite diversos modos de ação cuja principal função é a interação e inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) de insetos, causando sua inativação. Seus efeitos tóxicos são mais agudos para mamíferos podendo concentrar-se no tecido adiposo (COUTINHO *et al.*, 2005, SANTOS *et al.*, 2007).

Dentre os produtos utilizados como inseticidas, os compostos organofosforados, foram e ainda são importantes para as atividades agrícolas em todo o mundo, constituindo uma família muito diversificada de produtos químicos. Os organofosforados foram banidos da agricultura na União Europeia e nos Estados Unidos devido sua alta toxicidade (BARBOZA, 2018).

4.3 A ROTA DOS AGROTÓXICOS NO MEIO AMBIENTE

O destino final dos agrotóxicos no ambiente é influenciado por diversos processos químicos, físicos e biológicos, tais como: retenção (sorção), transformação (degradação biológica e decomposição química), transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações desses processos. Além desta variedade de processos, as diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas e nas características e condições ambientais, também afetam o processo de destino e degradação dos agrotóxicos (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA, 2018).

Os agrotóxicos são principalmente transportados a jusante dos campos agrícolas para as águas superficiais, por meio do escoamento superficial e interno. Agrotóxicos altamente solúveis em água são mais propensos a serem movidos durante a chuva ou irrigação. No entanto, os produtos adsorvidos nos compartimentos do solo também podem ser movidos por meio de movimentos suspensos de partículas e sedimentos durante eventos de chuvas intensas (WAUCHOPE *et al.*, 2004).

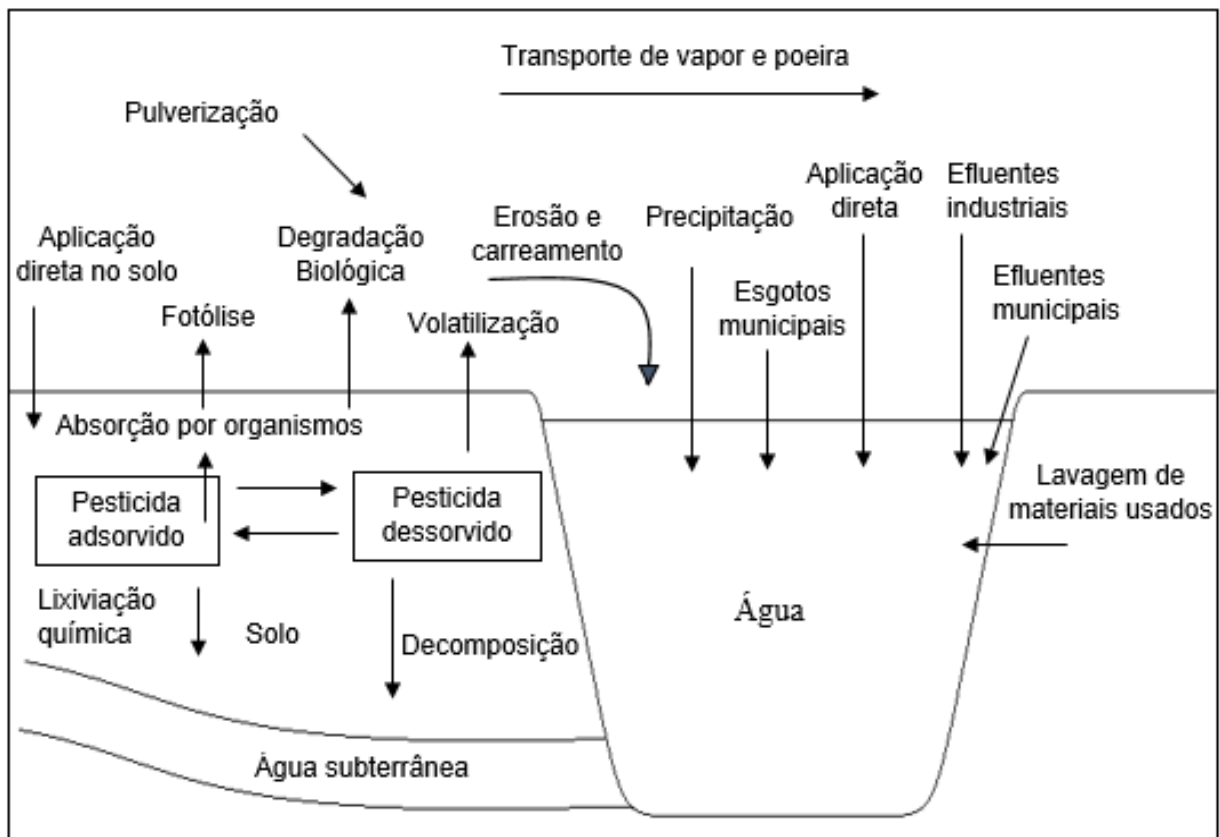
Os agrotóxicos atingem corpos d'água superficiais e subterrâneos a partir de fontes de contaminação difusa e pontual. A contaminação difusa por agrotóxicos é responsável pela detecção generalizada de baixa concentração de agrotóxicos, enquanto as fontes pontuais resultam na detecção de alta concentração de substâncias. Existem inúmeras maneiras dos agrotóxicos atingirem e contaminarem os corpos d'água superficiais (VRYZAS, 2018).

De acordo com Moreira *et al.* (2012), a detecção de resíduos de agrotóxicos em coletas de água de chuva, evidencia uma importante via de contaminação ambiental caracterizada pela volatilização dos agrotóxicos utilizados no meio rural. Sua acumulação ocorre em formações plúmbeas, transporte pelo vento e precipitação. Agrotóxicos em águas de chuvas indica uma contaminação atmosférica que afeta áreas não cultivadas, como os centros urbanos, tornando a extensão de possíveis impactos ou riscos sobre a saúde ambiental de difícil mensuração.

Além da quantidade da água de irrigações e chuvas que movem na superfície e pelo interior do perfil do solo, a composição das populações de microrganismos no solo, presença ou ausência de plantas, localização topográfica da região e práticas de manejo dos solos também afetam o movimento e o destino de agrotóxicos no ambiente, atingindo águas subterrâneas e superficiais (EMBRAPA, 2018).

A aplicação por pulverização, o plantio de sementes revestidas com agrotóxicos e a dispersão do vento levam à contaminação direta das águas superficiais (Figura 2). A dissipação de agrotóxicos no meio aquoso varia nas condições de temperatura, pH, luz solar, presença de matéria orgânica dissolvida, material em suspensão, algas, zooplâncton, peixes e microrganismos (VRYZAS, 2018).

Figura 2- Via de entrada dos agrotóxicos no meio ambiente aquático e mobilização a partir do solo.



Fonte: Dores e De-Lamonica-Freire (1999).

4.4 AÇÃO DOS ORGANOFOSFORADOS NOS SERES VIVOS

Os organofosforados intoxicam desde insetos a mamíferos principalmente pela fosforilação da AChE nas terminações nervosas. A enzima é crítica para o controle normal da transmissão do impulso nervoso das fibras nervosas para as células musculares e glandulares, e também para outras células nervosas nos gânglios automáticos e no cérebro (CHEREMISINOFF; KING, 1994).

Em doses suficientes de organofosforados, a perda da função enzimática permite o acúmulo de acetilcolina (ACh, a substância transmissora do impulso) nas junções neuromusculares colinérgicas (efeitos muscarínicos), nas junções esquelético-músculo-esqueléticas e nos gânglios autonômicos (efeitos nicotínicos) e no cérebro (CHERMISINOFF; KING, 1994).

No cérebro, altas concentrações de ACh acumuladas nas fendas sensoriais causam distúrbios sensoriais e comportamentais. A depressão das respirações e o edema pulmonar são as causas habituais de morte por intoxicação por organofosforados. A recuperação depende, em última instância, da geração de novas enzimas em todos os tecidos críticos (CHERMISINOFF; KING, 1994).

Os principais grupos de agrotóxicos responsáveis pela inibição da AChE são os organofosforados e carbamatos. A AChE vem sendo testada como biomarcador da presença de contaminantes no meio ambiente por meio de organismos não alvos. Os organofosforados e carbamatos estão entre os inseticidas mais utilizados mundialmente (VIDAL, 2011).

Pesquisadores observaram que os organofosforados são capazes de induzir humanos e animais a uma miopatia caracterizada pela degeneração de células musculares, comprometendo sobretudo a musculatura respiratória. Distúrbios neurológicos, necrose de neurônios e atrofia da camada molecular do córtex parietal foram alguns dos efeitos notados em mamíferos intoxicados por organofosforados (PEREZ *et al.*, 2006; CAVALIERE *et al.*, 2018).

Evidências comprovam que exposições decorrentes a organofosforados ocasionam a Neuropatia Periférica e a Doença de Parkinson. O tratamento com atropina pode ser eficaz na maioria dos casos de exposição a agentes anticolinesterásicos, no entanto, em alguns casos os efeitos provocados pela intoxicação são irreversíveis (BARTH; BIAZON, 2010).

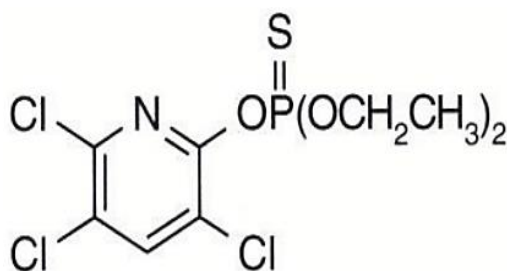
A exposição ao clorpirifós também pode provocar o desenvolvimento de tumores mamários com uma expressão reduzida de receptores de esteroides. O clorpirifós é capaz de afetar os níveis de mRNA de no tecido mamário atuando como um fator de risco para câncer de mama (VENTURA *et al.*, 2019).

Sawickia *et al.* (2019), confirmaram que o inseticida clorpirifós pode interferir no metabolismo da vitamina D3 nas células da pele. Os resultados também revelaram que a exposição ao clorpirifós induz a expressão no mRNA e o nível de proteína do receptor nuclear.

4.5 CLORPIRIFÓS: UM ORGANOFOSFORADO COM ÁTOMOS DE CLORO

O clorpirifós (O,O-dietil-O-3,5,6-tricloropiridin-2-piridinilfosforotioato) (Figura 3), é classificado como inseticida, formicida e acaricida do grupo dos organofosforados de ampla utilização, correspondendo a classe II da classificação toxicológica (Quadro 1). Sua aplicação é feita na região foliar das culturas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagem, soja, sorgo, tomate e trigo. Também pode ser aplicado em bananeiras (saco para proteção do cacho), no solo nas culturas de batata e milho, e no controle de formigas (ANVISA, 2018b; FLASKOS, 2012).

Figura 3- Estrutura molecular do clorpirifós



Fonte: ANVISA (2018b).

Quadro 1- Características gerais e propriedades físico-químicas do inseticida clorpirifós

Nome Químico (IUPAC)	O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
Número do CAS	2921 - 88 - 2
Fórmula química	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Massa molecular (g mol⁻¹)	350.58
Solubilidade em água a 20°C	1.05
Ponto de degradação (°C)	170

Fonte: Pesticide Properties Data Base (2018).

Segundo Centner (2018), petições submetidas à *Environmental Protection Agency* (EPA) têm procurado cancelar os registros de clorpirifós e revogar suas tolerâncias nos alimentos, devido aos efeitos adversos à saúde das pessoas. Sob as leis federais americanas, as tolerâncias para resíduos químicos de agrotóxicos nos alimentos devem fornecer uma certeza razoável de que nenhum dano resultará da exposição agregada de uma pessoa.

As reivindicações dos peticionários são analisadas de acordo com os requisitos legais para discernir se a EPA tinha uma base racional para a emissão da sua ordem de 2017, negando os pedidos de cancelamento de registros e revogação de tolerâncias. As evidências científicas consideradas pela EPA indicaram que as tolerâncias existentes não protegem as pessoas contra níveis inseguros de clorpirifós (CENTNER, 2018).

No Brasil, em 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução - RDC nº226, de 28 de setembro de 2004, considerou reavaliar a legislação do organofosforado clorpirifós, estabelecida pela Resolução-RDC nº 135, de 17 de maio de 2002 (ANVISA, 2004).

Com as novas mudanças, a resolução proíbe o uso do ingrediente ativo organofosforado clorpirifós em formulações de saneantes domissanitários. As empresas detentoras do registro de saneante domissanitário, para manterem suas marcas comerciais precisaram apresentar uma petição de modificação à ANVISA com a substituição do organofosforado clorpirifós na fórmula original, e que no rótulo fossem gravados em destaque os dizeres “NOVA FÓRMULA” (ANVISA, 2004).

Em 2012, cientistas publicaram que o clorpirifós está associado a potenciais riscos ao desenvolvimento neurológico. Os estudos comprovaram comportamentos autistas a exposições pré-natais ao inseticida organofosforado clorpirifós (LANDRIGAN; LAMBERTINI; BIRNBAUM, 2012).

4.6 CLORPIRIFÓS NA NATUREZA

A Resolução nº 357 de março de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), estabelece a classificação dos corpos hídricos conforme suas características e os padrões necessários para o lançamento de efluentes (BRASIL, 2005).

As águas doces possuem cinco classificações. A classe especial classifica-se as águas para consumo humano, após desinfecção e para a preservação das comunidades e ambientes aquáticos. A classe I corresponde às águas de recreação de contato primário, irrigação de hortaliças de consumo cru e proteção de comunidades aquáticas. Na classe II, para recreação de contato primário e preservação de comunidades aquáticas. A classe III para irrigação de culturas arbóreas, pesca amadora e dessedentação de animais e a classe IV para navegação e paisagismo (BRASIL, 2005).

Sobre as condições e padrões de qualidade, a Resolução CONAMA 357/2005 determina quais são os padrões de qualidade de água para cada categoria e quais os limites que devem ser respeitados de acordo com cada tipo de substância. Porém, nos parâmetros orgânicos e inorgânicos, o clorpirifós não está presente dentre a lista dos limites permitidos para cada tipo de agrotóxico em nenhuma das classes de águas (BRASIL, 2005).

No entanto, a Portaria de Consolidação nº 5 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde, estabelece um padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde humana, dentre os parâmetros o clorpirifós está presente na lista de agrotóxicos com o limite de concentração permitido de 0,030 mg. L⁻¹, para água de consumo humano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Pesquisas realizadas nas cidades de Lucas do Rio Verde e Campo Verde, em Minas Gerais, Moreira *et al.* (2012), verificaram a presença do clorpirifós em diferentes compartimentos naturais de água. Em amostras de águas superficiais detectaram clorpirifós na concentração de 0,00012 mg. L⁻¹. Em poços artesanais, amostras na concentração de 0,00004 mg. L⁻¹ foram detectadas. Concentrações de até 0,00088 mg. L⁻¹ de clorpirifós também foram detectados em amostras de água de chuva.

Pereira *et al.* (2016), avaliaram a concentração de pesticidas agrícolas na água subterrânea do Aquífero Furnas, na região dos Campos Gerais, em Ponta Grossa, PR. Além de outros agrotóxicos, detectaram a presença de clorpirifós na concentração de 0,009 mg. L⁻¹.

Em análise de sedimento de fundo do rio Cuiabá, importante tributário do rio Paraguai, cuja bacia é de grande importância por agasalhar o Pantanal, Possavatz *et al.* (2014), detectaram a presença de clorpirifós na concentração de 0,0085 mg. L⁻¹. Silva e Cerejeira (2012), analisaram águas superficiais coletadas em Alverca do

Campo e no rio Almonda em Portugal. Nas amostras, detectou-se clorpirifós na concentração de 0,033 mg. L⁻¹.

Nos Estados Unidos, por meio de um sistema de monitoramento de águas superficiais, as estimativas das concentrações de clorpirifós durante todo o período 1992 e 2011 foram de 0,000005, 0,0000066, 0,0000214 e 0,0000852 mg. L⁻¹ (MOSQUIN; ALDWORTH; POLETIKA, 2015). Em Bangladesh a maior medida em águas doces superficiais foi de 0,009 mg. L⁻¹ de clorpirifós (SUMON *et al.*, 2018). Em rios espanhóis foram encontradas concentrações de 0,000036 mg. L⁻¹ de clorpirifós (VERA *et al.*, 2018).

Pesquisas constaram que as concentrações da maioria dos OP's na água e nos sedimentos do rio Volturno, na Itália e de seu estuário foram inferiores aos valores indicados em pesquisas anteriores. Porém a concentração média de clorpirifós foi de 0.0054 mg. L⁻¹, no rio Volturno e no estuário, considerado alto, mostrando que a integridade ecológica do curso de água do rio está possivelmente em risco (TRIASSI *et al.*, 2019).

4.7 PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA

No Brasil, foram desenvolvidos parâmetros para mensurar a qualidade e os padrões exigidos das águas de abastecimento público de acordo com o seu uso. O Índice de Qualidade das Águas (IQA) é o principal indicador qualitativo desenvolvido para avaliar a qualidade da água após o tratamento convencional. Os parâmetros para os cálculos do IQA são: temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, resíduo total, demanda bioquímica de oxigênio, coliformes termotolerantes, nitrogênio total, fósforo total e turbidez (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS- ANA, 2019).

Os resultados da avaliação do IQA devem levar em consideração os possíveis usos para a água avaliada. Por exemplo, um IQA com valores baixos, indica que a água é de má qualidade para abastecimento, mas essa mesma água pode ser utilizada em usos menos exigentes, como geração de energia, navegação e paisagismo (ANA, 2019).

A quantidade de oxigênio dissolvido (OD) está entre os principais índices de qualidade de água. O OD é um fator essencial limitante para os processos de manutenção da vida aquática e de autodepuração, tanto no despejo de efluentes tratados quanto para os sistemas aquáticos naturais. As bactérias responsáveis no

processo de degradação da matéria orgânica, necessitam consumir oxigênio durante os processos respiratórios, contribuindo para a diminuição da concentração de OD no meio aquáticos (COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO BÁSICO E CONTROLE DE POLUIÇÃO DAS ÁGUAS- CETESB, 2019).

A queda da concentração de OD na água é uma das principais causas de mortalidade dos organismos aquáticos em ecossistemas deturpados, contribuindo para a degradação dos corpos d'água. Contaminantes presentes em corpos hídricos, reduzem a taxa metabólica de organismos aquáticos, mas também aumenta a captação crítica de oxigênio, reduzindo a capacidade de manter a captação de oxigênio constante (CETESB, 2019).

Valores de OD menores que 2,00 mg. L⁻¹ pertencem a uma condição chamada hipóxia. A hipóxia representa condições perigosas para a sobrevivência dos organismos aquáticos, muitas espécies não resistem antes mesmo do ambiente entrar em estado de hipóxia (CETESB, 2019).

De acordo com as normas da ABNT NBR 15088: 2016, as condições ideais para bioensaio e criações de peixes são de pH entre 5,0 à 9,0; temperatura entre 23 °C e 27 °C e oxigênio dissolvido de até 4,00 mg. L⁻¹. Valores fora dos limites indicados interfere nos resultados de testes com bioindicadores (ABNT, 2016).

Os sistemas de agricultura intensiva são caracterizados pela intensa utilização de tecnologia, que envolve a mecanização e o alto uso de insumos como fertilizantes, herbicidas e inseticidas. Nesses sistemas, o problema de erosão pode ocorrer pelo manejo inadequado do solo e à reposição insuficiente de carbono orgânico. Essas condições favorecem a degradação física do solo, aumentando a contaminação das águas superficiais devido os sedimentos, nutrientes solúveis e particulados e dos agroquímicos, reduzindo a disponibilidade de oxigênio dissolvido nas águas (MERTEN; MINELLA, 2002).

Em rios que sofrem constantes ações degradantes, os peixes são frequentemente expostos a um aumento da temperatura da água, devido ao aquecimento global. Pesquisas mostraram que altas temperaturas causam alterações comportamentais e fisiológicas em organismos aquáticos. Portanto, águas que sofrem aumento na temperatura, agravam os efeitos de agrotóxicos em peixes no nível molecular e celular, como efeitos genotóxicos (taxa de micronúcleos) e danos celulares irreversíveis das brânquias e fígado (apoptose, inflamação, necrose) (JACQUIN *et al.*, 2019).

4.8 ORGANISMOS BIOINDICADORES

Os organismos bioindicadores são aqueles capazes de indicar as mudanças ambientais causadas por ações antrópicas. Os bioindicadores possuem relacionamento direto com elementos abióticos, tornando-se altamente sensíveis as perturbações humanas. Estresses ambientais são oriundos de ações antropogênicas, podendo ser descrito como um estado que demanda energia para “tamponar” os seus efeitos levando a desestabilidade de funções regulares dos organismos (BAGLIANO, 2012).

O emprego de diferentes bioindicadores abrangendo distintos níveis de organização biológica possibilita o conhecimento sobre a que nível o contaminante interage com o organismo, e a que nível este é mais suscetível à ação do contaminante. Os resultados de pesquisas com bioindicadores, são essenciais para traçar estratégias eficazes que permitam recuperar a biodiversidade dos ecossistemas aquáticos (ARIAS *et al.*, 2007).

Em função da grande heterogeneidade física dos ecossistemas, Arias *et al.* (2007), afirmam que se deve utilizar os bioindicadores mais presentes em um ecossistema a ser estudado. Exemplo: utilizar a comunidade de peixes seria uma metodologia mais adequada para grandes rios, pois estes apresentam em geral misturas complexas de contaminantes, portanto, a alta especificidade de respostas dos bioindicadores torna-se mais eficiente.

Em rios de pequena dimensão, a fauna de macroinvertebrados pode ser extremamente rica, enquanto que a fauna de peixes pode não ser suportada, e em geral seus representantes são de pequeno porte, o que dificulta os testes com os bioindicadores disponíveis (ARIAS *et al.*, 2007).

A eliminação de compostos xenobióticos (compostos químicos estranhos), dependem dos processos de metabolismo e excreção. Estes compostos são persistentes quando esses processos não funcionam adequadamente. Isto pode ocorrer por várias razões: os processos são ineficazes, os compostos estão ligados a outras moléculas de tal forma que eles não estão disponíveis para o metabolismo ou as taxas de metabolismo e eliminação simplesmente não podem lidar com as taxas de absorção (LIVINGSTONE, 1992).

Pensa-se que estes processos evoluíram para auxiliar a desintoxicação de xenobióticos lipofílicos de ocorrência natural. Eles variam muito entre espécies e

diferentes grupos de organismos, por exemplo, invertebrados aquáticos em comparação com vertebrados. Consequentemente, produtos químicos particulares podem ser persistentes em algumas espécies, mas não em outras. Exemplo: muitos hidrocarbonetos são fortemente persistentes em invertebrados aquáticos, mas geralmente muito menos em vertebrados aquáticos (LIVINGSTONE, 1992).

Segundo Brogan e Relyea (2017), entender os processos que regulam os impactos dos contaminantes na natureza é um desafio cada vez mais importante. Para agrotóxicos em águas superficiais, a capacidade das plantas aquáticas sorverem ou se ligarem a compostos hidrofóbicos, foi identificada como um mecanismo primário pelo qual a toxicidade pode ser mitigada (isto é, o modelo baseado na sorção).

No entanto, pesquisas recentes mostram que plantas submersas também podem mitigar rapidamente a toxicidade de inseticidas menos hidrofóbicos via hidrólise alcalina (isto é, o modelo baseado em hidrólise) impulsionado pelo aumento do pH da água resultante da fotossíntese. Porém, ainda não se sabe quão generalizáveis são esses mecanismos de mitigação entre a ampla variedade de inseticidas, e se é possível determinar regras gerais sobre quais tipos de produtos químicos podem ser mitigados por cada mecanismo (BROGAN; RELYEA, 2017).

Utilizar bioindicadores em pesquisas de qualidade de água possuem maiores vantagens comparado apenas com os parâmetros físicos e químicos. Os bioindicadores são mais eficazes e rápidos na obtenção de resultados, possuem menor relação de custo benefício e são mais suscetíveis a uma ampla variedade de estressores nos ecossistemas. Pesquisas com organismos biondicadores em análises de qualidade de água, permite uma avaliação acerca do funcionamento de um determinado ecossistema contribuindo para um monitoramento ambiental em larga escala (QUEIROZ; TRIVINHO-STRIXINO; NASCIMENTO, 2000).

Utilizar estudos com bioindicadores aquáticos tornou-se uma maneira inteligente de avaliar a maneira com que os contaminantes podem afetar direta ou indiretamente a qualidade dos corpos d'água. Compreender a atuação de contaminantes em diferentes organismos, contribui para a importância de preservar e conservar os ecossistemas mantendo o equilíbrio ambiental (SILVA-DE-SÁ *et al.*, 2019).

4.9 EFEITOS DO CLORPIRIFÓS EM ORGANISMOS BIOINDICADORES

Estudos em animais demonstraram o efeito de potencialização quando dois ou mais organofosforados são absorvidos simultaneamente: enzimas críticas para a degradação de um são inibidas pelo outro, além de certos organofosforados que são excepcionalmente propensos ao armazenamento em tecido adiposo, prolongando a necessidade de um antídoto, pois, o pesticida armazenado é liberado de volta às circulações (CHEREMISINOFF; KING, 1994).

A AChE é uma enzima do tipo serina hidrolase, cuja principal função é modular a neurotransmissão nas sinapses colinérgicas, sendo, portanto, o alvo primário de alguns agrotóxicos e metais pesados. Sua inibição em organismos aquáticos tem sido utilizada como um indicador da presença desses contaminantes em corpos d'água. A AChE é considerada como um biomarcador confiável de exposição a agrotóxicos, embora em moluscos essa atividade seja frequentemente muito baixa ou indetectável (De ARAÚJO *et al.*, 2018; SOLÉ *et al.*, 2018).

Estudos indicaram efeitos tóxicos do clorpirifós em concentrações ambientais na espécie de planta aquática *Potamogeton pusillus*. Foram analisadas diversas respostas bioquímicas incluindo bioacumulação, defesa e biomarcadores de danos. A resposta do biomarcador foi observada na concentração de 0,0000000035 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Os resultados mostraram que este inseticida promove estresse oxidativo e danos biomoleculares em *P. pusillus* após uma exposição aguda. O estresse oxidativo foi evidenciado por uma ativação enzimática antioxidante e uma diminuição significativa no teor de pigmentos nas folhas (BERTRAND *et al.*, 2017).

Raymundo *et al.* (2019), testaram a sensibilidade de crustáceos cladóceros das espécies *Ceriodaphnia silvestrii*, *Diaphanosoma birgei*, *Daphnia laevis*, *Moina micrura* e *Macrothrix flabelligera* ao clorpirifós. As concentrações letais que causaram morte em 50% (CL50) dos indivíduos de cada espécie, foi de respectivamente 0,000039, 0,000211, 0,000216, 0,000463 e 0,000619 mg. L⁻¹ de clorpirifós.

Estudos realizados em adultos do crustáceo *Daphnia magna*, revelaram que a espécie exposta nas concentrações de 0,00005 e 0,00025 mg. L⁻¹ de clorpirifós, apresentou alterações enzimáticas provocando mudanças comportamentais, como dificuldade de natação. Notou-se uma relação entre as modificações enzimáticas e as respostas comportamentais causadas pela exposição ao clorpirifós (FERRARIO *et al.*, 2018).

Banaee *et al.* (2019), submeteram a espécie de crustáceo *Astacus leptodactylus* para testes toxicológicos, comparando a toxicidade dos agrotóxicos clorpirifós e glifosato. Os valores de CL50 de clorpirifós para *A. leptodactylus* foi de $0,04955 \pm 0,0046 \text{ mg. L}^{-1}$, enquanto que para glifosato a CL50 foi de $7,83 \pm 0,50 \text{ mg. L}^{-1}$. Estes resultados mostram que o clorpirifós é mais tóxico que glifosato para esta espécie de crustáceo, levando-o a um colapso da homeostase celular.

Silva e Cerejeira (2014), analisaram a toxicidade de clorpirifós em diferentes organismos. Em algas, notaram que a concentração que causou inibição em 50% (CI50) dos exemplares de algas, foi de $0,48 \text{ mg. L}^{-1}$ de clorpirifós. O crustáceo *Daphnia sp.*, apresentou CL50 de $0,0017 \text{ mg. L}^{-1}$. Já para os peixes, a CL50 foi de $0,002 \text{ mg. L}^{-1}$ de clorpirifós.

Zhao e Chen (2016), testaram a toxicidade do clorpirifós em diferentes bioindicadores. A CI50 das algas *Chlorella sp.*, *Dunaliella tertiolecta* e *Isochrysis galbana*, foram de respectivamente 1,29, 0,769 e $0,138 \text{ mg. L}^{-1}$. Já nos crustáceos *Daphnia ambigua*, *Palaemon macrodactylus* e *Rhepoxynius abronius*, a CL50 foi de 0,000035, 0,000050 e $0,000099 \text{ mg. L}^{-1}$ de clorpirifós.

Os caramujos da espécie *Planorbarius corneus*, foram submetidos as concentrações de 0,0004 e $0,005 \text{ mg. L}^{-1}$ de clorpirifós por 14 dias. Parâmetros de reprodução, e das enzimas B-esterases e gutationa S-transferase foram estudados. O inseticida induziu uma diminuição nas eclosões e na sobrevivência dos filhotes. O biomarcador mais sensível foi a atividade de carboxilesterase. A exposição subcrônica ao clorpirifós pode causar um declínio na espécie *Planorbarius corneus* (RIVADENEIRA *et al.*, 2013).

Em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, observou-se a CL50 em $0,098 \text{ mg. L}^{-1}$ de clorpirifós, provocando inibição da AChE, induzindo ao estresse oxidativo e prejudicando na síntese de hormônios esteroides em peixes. Os níveis de testosterona e estradiol foram menores que os peixes do grupo controle (ORUÇ, 2010).

Em concentrações 0,025 e $0,050 \text{ mg. L}^{-1}$ de clorpirifós, a espécie de peixe *Cyprinus carpio* apresentou mudanças significativas em todos os parâmetros bioquímicos do sangue, diminuindo as atividades da AChE no plasma, em comparação com os grupos controle (HATAMI; BANAEE; HAGHI, 2019).

Na espécie de peixe *Acanthochromis polyacanthus* exposta ao clorpirifós, notaram a inibição da AChE e das atividades musculares nas concentrações de 0,001,

0,01 e 0,1 mg. L⁻¹ do inseticida, provocando estresse oxidativo no fígado. Já em *Poecilia reticulata*, nas concentrações de 0,00002 e 0,002 mg. L⁻¹ de clorpirifós, afetaram o comportamento de acasalamento, o número de descendentes e a sobrevivência da prole (BOTTÉ *et al.*; 2012, De SILVA; SAMAYAWARDHENA, 2005).

Nos peixes espinhosos da espécie *Gasterosteus aculeatus*, notou-se que após exposição ao clorpirifós nas concentrações de 0,00175 e 0,00088 mg. L⁻¹, o pesticida induziu um potencial genotóxico. Além disso, na maior concentração de clorpirifós, uma desestabilização precoce da imunidade inata foi observada. Este estudo destacou a utilidade do estresse nas respostas para melhor entender o impacto dos contaminantes na saúde do organismo (MARCHAND *et al.*, 2017).

Alevinos da espécie *Lates calcarifer*, foram expostos ao clorpirifós, apresentando CL50 de 0,0011 mg. L⁻¹. O clorpirifós afetou a atividade da enzima esterase, da superóxido dismutase e da malato desidrogenase em concentrações sub-letais, induzindo a alterações histopatológicas nas brânquias e nos olhos, afetando a respiração e a deficiência visual (MARIGOUDAR *et al.*, 2018).

Os peixes da espécie *Cyprinus carpio*, foram expostos a duas concentrações subletais de clorpirifós (0,040 e 0,080 mg. L⁻¹). Nestas concentrações, observaram que houve uma diminuição significativa na contagem de glóbulos vermelhos, na concentração de hemoglobina e nível de hematócrito. Houve um aumento na contagem de glóbulos brancos dos peixes tratados com clorpirifós (YONAR, 2018).

Em juvenis de uma espécie de peixe bagre (*Clarias gariepinus*), testaram concentrações de 0,40, 0,55, 0,70 e 0,85 mg. L⁻¹ de clorpirifós, resultando na CL50 de 0,30 mg. L⁻¹. Após os ensaios, análises hematológicas foram realizadas, revelando que as concentrações induziram ao estresse oxidativo e alteraram os níveis hematológicos na espécie (ADEWUMI *et al.*, 2018).

A enzima Carboxilesterases (CEs), exortam vários papéis fisiológicos, mas também respondem a agrotóxicos. A sensibilidade ao clorpirifós, foi avaliada no molusco *Ruditapes decussatus*. Observou-se que a atividade da CEs em moluscos é uma boa alternativa à atividade da AChE, que é um biomarcador tradicionalmente usado em programas de monitoramento de pesticidas. Isto é apoiado pela baixa atividade de AChE neste tipo de mexilhão, e pela alta taxa de hidrólise de CEs juntamente com sua alta afinidade com pesticidas OP's (DE-ARAÚJO *et al.*, 2018; SOLÉ *et al.*, 2018).

4.10 ORGANISMOS AQUÁTICOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE TOXICIDADE

4.11 MACRÓFITAS (*LEMNA MINOR*, *AZOLLA CAROLINIANA* E *WOLFFIA BRASILIENSIS*)

As Lemnas são macrófitas flutuantes pertencente à família Lemnaceae. São macrófitas comuns que geralmente cresce em águas tranquilas. Popularmente chamada de “Lentilha d’água” ou “Erva-de-pato”, as Lemnas possuem altas taxas de reprodução nos mais variados ecossistemas aquáticos (APPENROTH *et al.*, 2010).

A Lemna é considerada como um importante organismo bioindicador para diversas organizações, principalmente por ser um dos primeiros organismos a serem afetados pela poluição aquática, e por apresentarem acelerado crescimento e reprodução. Geralmente, a resposta da Lemna à contaminantes é avaliada por meio de alterações nas taxas de crescimento das frondes (folhas) e raiz (KISS; KOVÁTS; SZALAY, 2003).

A *Azolla caroliniana* é uma macrófita flutuante pertencente à família Salviniaceae. A sua forma é muito reduzida e possui a capacidade de absorver o nitrogênio do ar atmosférico por meio da simbiose com a alga *Anabaena*, que vive no tecido das folhas (RUSCHEL, 1990).

Atualmente, as espécies do gênero *Azolla* tem sido mais utilizada como fonte de nitrogênio e outros macro e micronutrientes na cultura arrozeira irrigada, como aceleradora da decomposição da palhada do arroz, facilitando o melhoramento do solo para o plantio subsequente. Há registro do aumento de produção por influência da introdução da *Azolla* no cultivo de arroz em diversos locais (RUSCHEL, 1990).

Segundo Silva *et al.* (2012), a *Azolla* pode ser empregada no monitoramento de herbicidas, devido à grande sensibilidade desse bioindicador na detecção desses contaminantes amplamente utilizados, podendo ser usada em estudos complementares de ecotoxicologia e monitoramento ambiental de agrotóxicos.

A família das Lemnoideae é considerada as menores angiospermas, sendo *Wolffia* o gênero com o menor tamanho de fronde e flores. São plantas de difícil interpretação morfológica devido seu tamanho diminuto, e os termos utilizados para descrição, são em parte diferentes dos usados para outras plantas (PEREIRA; POTT; TEMPONI, 2016).

Quase todos os gêneros de Lemnaceae são relatados como tendo alto potencial de fitorremediação, levando à sua extensa utilização como um organismo

para testes de toxicidade em diferentes águas residuais municipais e industriais contaminadas por metais. Possuem reprodução e crescimento rápidos, redução microbiana e fitoplanctônica e alto potencial de nutrientes e acúmulo de metal. Estes são os fatores que desencadearam grande parte de pesquisas a utilizar gêneros de Lemnaceae, enfocando seu potencial de fitorremediação (ALI *et al.*, 2016).

4.12 CARAMUJO (*POMACEA CANALICULATA*)

O caramujo *Pomacea canaliculata* pertence ao Filo Mollusca e a classe Gastropoda. Sua distribuição ocorre em toda a Bacia Amazônica Inferior e Bacia do Prata, Sudeste do Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai. O caramujo também invadiu partes do sul dos Estados Unidos (Texas e Flórida, até o centro de Ohio) e no Havaí (GHESQUIERE, 2005).

Sua dieta é composta por todos os tipos de plantas. Esta espécie passa seus dias submersa ou escondida em vegetação, é mais ativa à noite. A taxa de atividade varia com a temperatura da água. Como todas as espécies invasoras, o *Pomacea canaliculata* tem o potencial para competir com espécies nativas por recursos limitados. Sua reprodução é rápida e profusa (GHESQUIERE, 2005).

Esta espécie foi deliberadamente introduzida no Sudeste Asiático por volta de 1980, subsequentemente sofreu uma rápida dispersão intencional ou acidental em muitos países da região. Também foi introduzido na América do Norte e Central e no Havaí. Nesta contribuição, registrou-se a presença de *P. canaliculata* na Patagônia, avaliando a possível influência da mudança climática no novo estabelecimento desta espécie invasora (DARRIGRAN; DAMBORENEA; TAMBUSSI, 2011).

4.13 CAMARÃO PITÚ (*MACROBRACHIUM ACANTHURUS*)

O camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus*, é um crustáceo da ordem Decapoda e família Palaemonidae, classificado por Wiegmann em 1836, é popularmente conhecido como “Pitú”. O *M. acanthurus* apresenta alta fecundidade que aumenta em função do comprimento e do peso dos animais, fazendo com que a espécie seja bastante adequada para fins comerciais (VALENTI; MELLO; LOBÃO, 1989)

Segundo Albertoni, Palma-Silva e Esteves (2002), o *M. acanthurus* é encontrado em várias regiões da costa brasileira. No norte do estado do Rio de Janeiro, verificaram que as fêmeas são encontradas em uma maior propensão perto do oceano, os machos são encontrados em maior número na região mais interna e em meio as macrófitas, sugerindo que a fecundação ocorre nesta área. As fêmeas então viajam para a área mais próxima do oceano para desovar.

Pesquisas realizadas com o *M. acanthurus* revelaram que a taxa de consumo de oxigênio do camarão de água doce varia de acordo com a temperatura e salinidade da água. As taxas respiratórias diminuíram com o aumento da salinidade, sendo esse efeito mais acentuado em temperaturas mais baixas e praticamente ausente a 35,0 °C. Os dados sugerem que *M. acanthurus* tem a capacidade osmorregulação, mostrando que esta espécie é um conformador de oxigênio, com uma capacidade muito limitada de suportar ambientes com baixas concentrações de oxigênio (GASCALEYVA; MARTINEZ-PALACIOS; ROSS, 1991).

4.14 PEIXES PLATY E MATO-GROSSO (*XIPHOPHORUS MACULATUS* E *HYPHESSOBRYCON EQUES*)

O *Xiphophorus maculatus*, também conhecido popularmente como “Platy”, é um pequeno peixe de água doce ornamental da ordem Cyprinodontiformes, e da família Poeciliidae. O *X. maculatus* é nativo do México, Belize, Guatemala e Honduras. Foi introduzido em pelo menos 18 países e territórios, incluindo a Austrália, principalmente por causa da translocação e liberação mediada pelo homem (FROESE; PAULY, 2007)

A temperatura é um fator ambiental que tem sido um assunto frequente de estudos, uma vez que afeta direta ou indiretamente todos os organismos vivos. Pesquisas com a determinação dos limites térmicos para *X. maculatus*, constatou que o peixe foi afetado pela temperatura de aclimação. Essa espécie tropical é mais tolerante ao calor do que ao frio e não resistiria às baixas temperaturas típicas do inverno do sul do Brasil. O Platy pode se adaptar a ambientes naturais em regiões de temperaturas médias anuais em torno de 20 a 25°C, ou ser mantido em aquários com outras espécies ornamentais que preferem essa faixa de temperatura (PRODOCIMO; FREIRE, 2001).

A espécie de peixe *Hyphessobrycon eques*, popularmente conhecida como “Mato-Grosso”, é uma espécie de peixe neotropical que habita a parte baixa da coluna de água, onde vive sempre em grandes cardumes. O *H. eques* possui uma grande importância econômica por ser um peixe de pequeno tamanho, ornamental e de água doce, tornando-se a principal fonte de renda para as famílias que utilizam da comercialização do peixe como um meio de subsistência. Sendo sensível às mudanças em seu ambiente natural, o *H. eques* é um potencial bioindicador de mudanças ambientais causadas por contaminantes (AGUINAGA *et al.*, 2014; CRUZ *et al.*, 2016).

Pesquisas observaram que o *H. eques* é uma espécie em que ambos os sexos apresentaram um coeficiente angular de relação peso e comprimento. Para as fêmeas, observou-se um longo período reprodutivo, com maior intensidade reprodutiva de janeiro a junho. O longo período reprodutivo intensificado pela desova parcial, notou-se maior proporção de fêmeas, mostrando que a espécie possui estratégias necessárias para a sobrevivência e rápido crescimento populacional, comuns em pequenas espécies caracterizadas como estrategistas (SANTANA; TONDATO; SUAREZ, 2019).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

Os ensaios de toxicidade aguda com os organismos não alvos *Lenma minor*, *Azolla caroliniana*, *Wollfia brasiliensis*, *Pomacea canaliculata* e *Macrobrachium acanthurus*, foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia de Agrotóxicos (LEEA) do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (UNIFEB), Barretos - SP.

A realização desta pesquisa foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (UNIFEB), Barretos-SP, sob o Protocolo nº 02_2019.

5.2 INSETICIDA UTILIZADO

O inseticida utilizado nos ensaios foi o clorpirifós (CAS n°2921-88-2) na formulação comercial de 480 g. L⁻¹.

5.3 Ensaios de toxicidade aguda com organismos não-alvos

5.3.1 Ensaio de toxicidade com macrófitas (*Lemna minor*, *Azolla caroliniana* e *Wolffia brasiliensis*).

Os ensaios de toxicidade aguda para as macrófitas foram realizados de acordo com os procedimentos do *Guideline for testing of chemicals – Lemna minor Growth Inhibition* da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico- OECD (2002), adaptada para os ensaios com a *A. caroliniana* e *W. brasiliensis*, garantindo a padronização dos resultados.

As macrófitas foram aclimatadas em meio Hoagland's, composto de água destilada reconstituída com nutrientes e pH 5,8. Os organismos foram mantidos em sala com temperatura controlada de 24,0 ± 1,0 °C, intensidade de luz de aproximadamente 6.500 lux e fotoperíodo de 12 horas.

Para os ensaios de toxicidade aguda com *L. minor*, foram selecionados quatro exemplares com três frondes em bom aspecto sanitário, nutricional e de tamanho homogêneo. Os ensaios foram realizados em sala climatizada com as mesmas condições de aclimação e com duração de sete dias (Figura 4).

No ensaio de toxicidade aguda para *A. caroliniana*, foram selecionados cinco exemplares com frondes em bom aspecto sanitário, nutricional e de tamanho homogêneo. Os ensaios foram realizados na sala climatizada com as mesmas condições de cultivo e com duração de sete dias (Figura 5).

No ensaio de toxicidade aguda da *W. brasiliensis*, para a captura de uma quantidade homogênea da macrófita, foi utilizada uma seringa vazia conectada a uma mangueira de 0,45 mm de diâmetro. A quantidade de frondes coletadas para cada recipiente foi equivalente ao tamanho da área da circunferência da mangueira (Figura 6). A sensibilidade do lote de macrófitas foi avaliada por meio do ensaio com cloreto de sódio como substância de referência (Quadro 2).

Quadro 2- Valores das concentrações de inibição com cloreto de sódio como substância de referência para macrófitas

Macrófitas	Concentrações de Inibição e limites para Clorpirifós		
	CI50	Limite Inferior	Limite Superior
<i>L. minor</i>	0,30 mg. L ⁻¹	0,20 mg. L ⁻¹	0,35 mg. L ⁻¹
<i>A. caroliniana</i>	0,40 mg. L ⁻¹	0,30 mg. L ⁻¹	0,53 mg. L ⁻¹
<i>W. brasiliensis</i>	4,85 mg. L ⁻¹	3,42 mg. L ⁻¹	6,88 mg. L ⁻¹

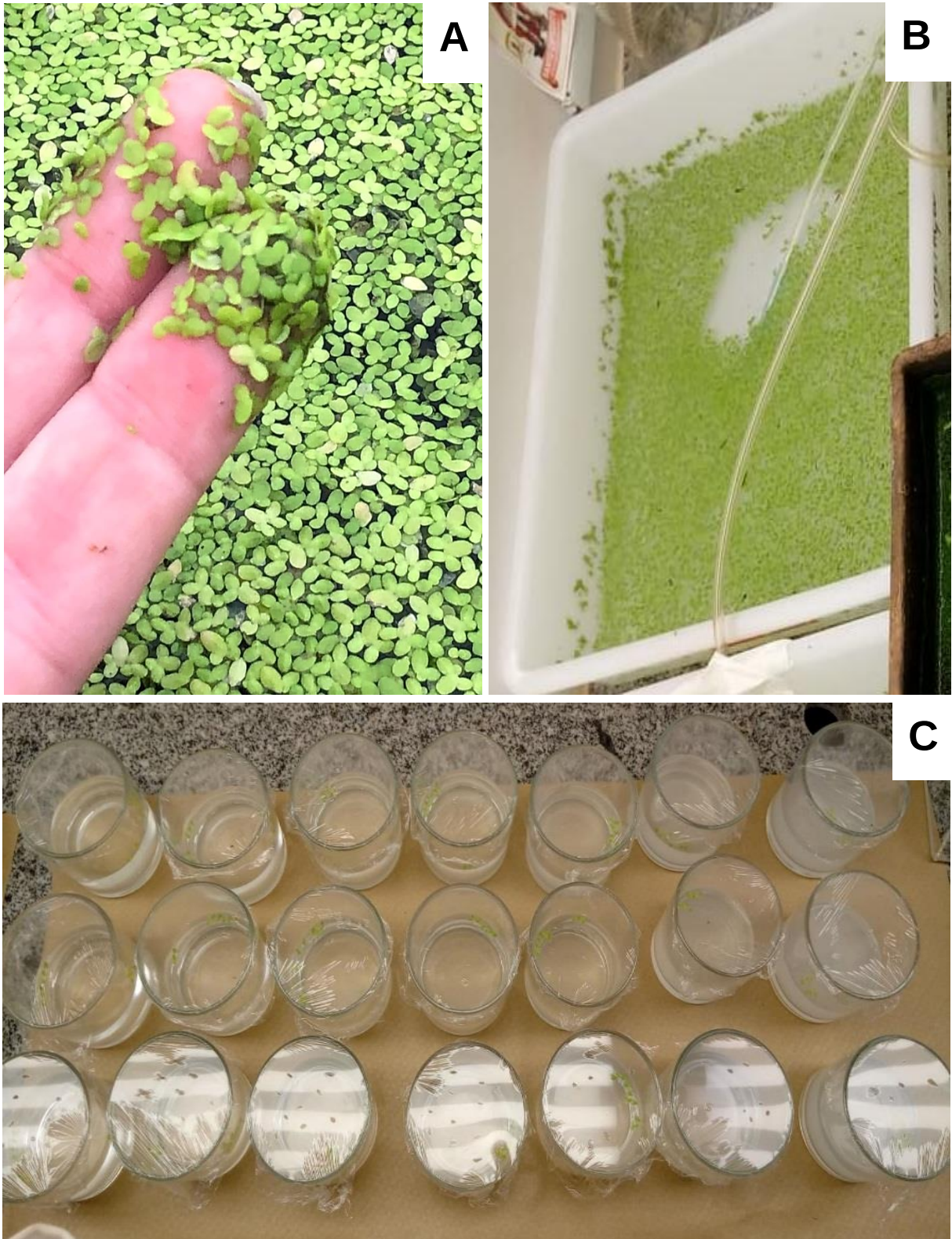
Fonte: Próprio autor.

Dessa forma, os organismos estavam em condições normais de sanidade e sensibilidade de acordo com a carta controle de outros lotes utilizados anteriormente no laboratório. Após os ensaios com a substância de referência, foram realizados ensaios preliminares com o inseticida para determinar o intervalo de concentração que causa inibição de crescimento, clorose (perda de cor das frondes) e necrose (mortalidade) das macrófitas.

Seguido do ensaio preliminar, determinou-se os intervalos das concentrações para o ensaio definitivo. As macrófitas foram submetidas às concentrações de 100,0; 200,0; 400,0; 800,0; 1.600,0 e 3.200,0 mg. L⁻¹ de clorpirifós durante sete dias. Foi utilizado um grupo controle para cada repetição.

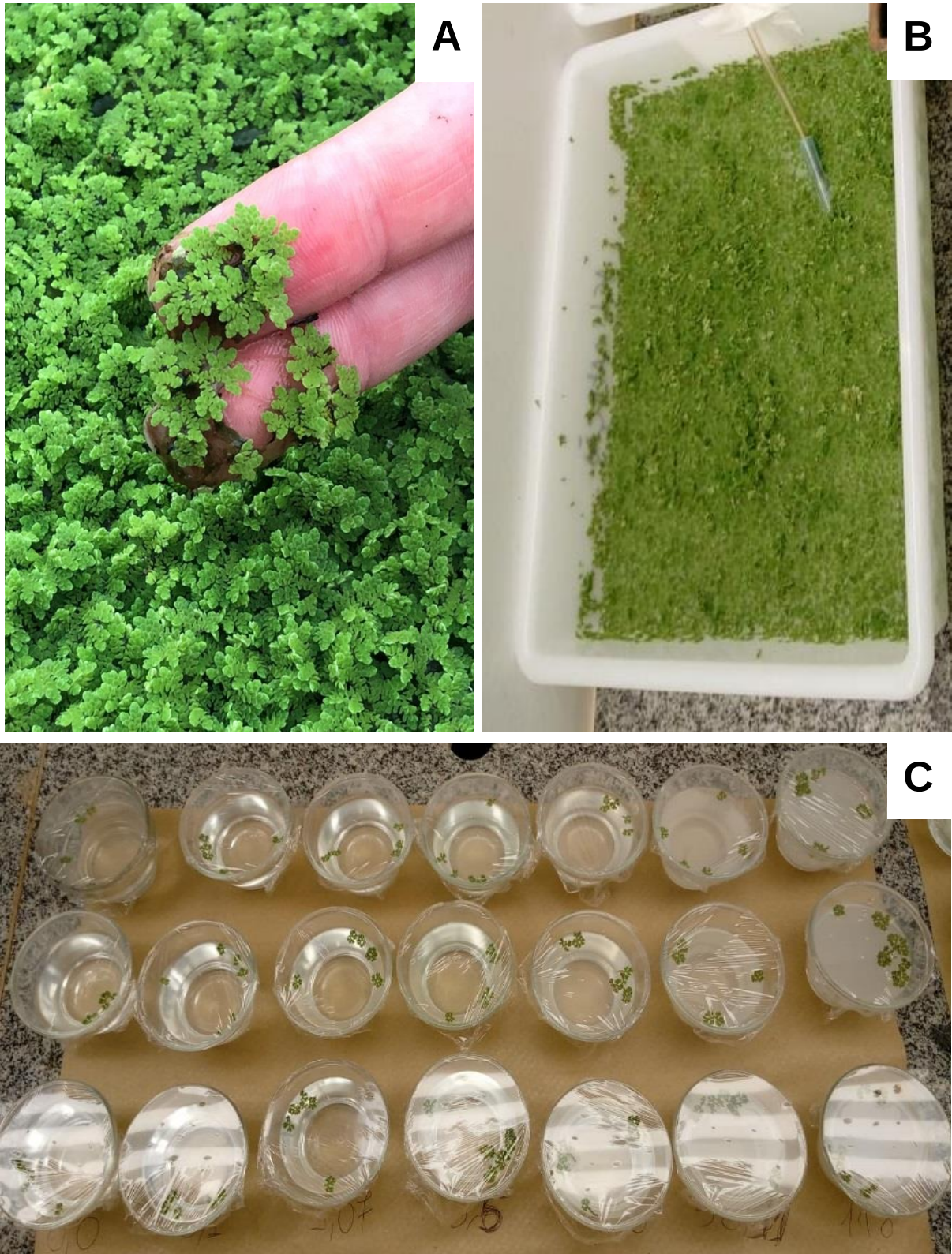
As avaliações foram realizadas no 3º, 5º e 7º dia de exposição ao inseticida. Para a *L. minor*, avaliou-se a quantidade de frondes nascidas, clorose e necrose. Para *A. caroliniana* e *W. brasiliensis*, por apresentarem morfologias diferentes da *L. minor*, a avaliação foi realizada por percentual. A quantidade de frondes com clorose e necrose eram avaliadas de 0 a 100%.

Figura 4- Aspectos do cultivo e do ensaio de toxicidade com *Lemna minor*. A) Frondes de *Lemna minor*; B) Recipiente com *Lemna minor* durante aclimação; C) Ensaio com *Lemna minor* em triplicata



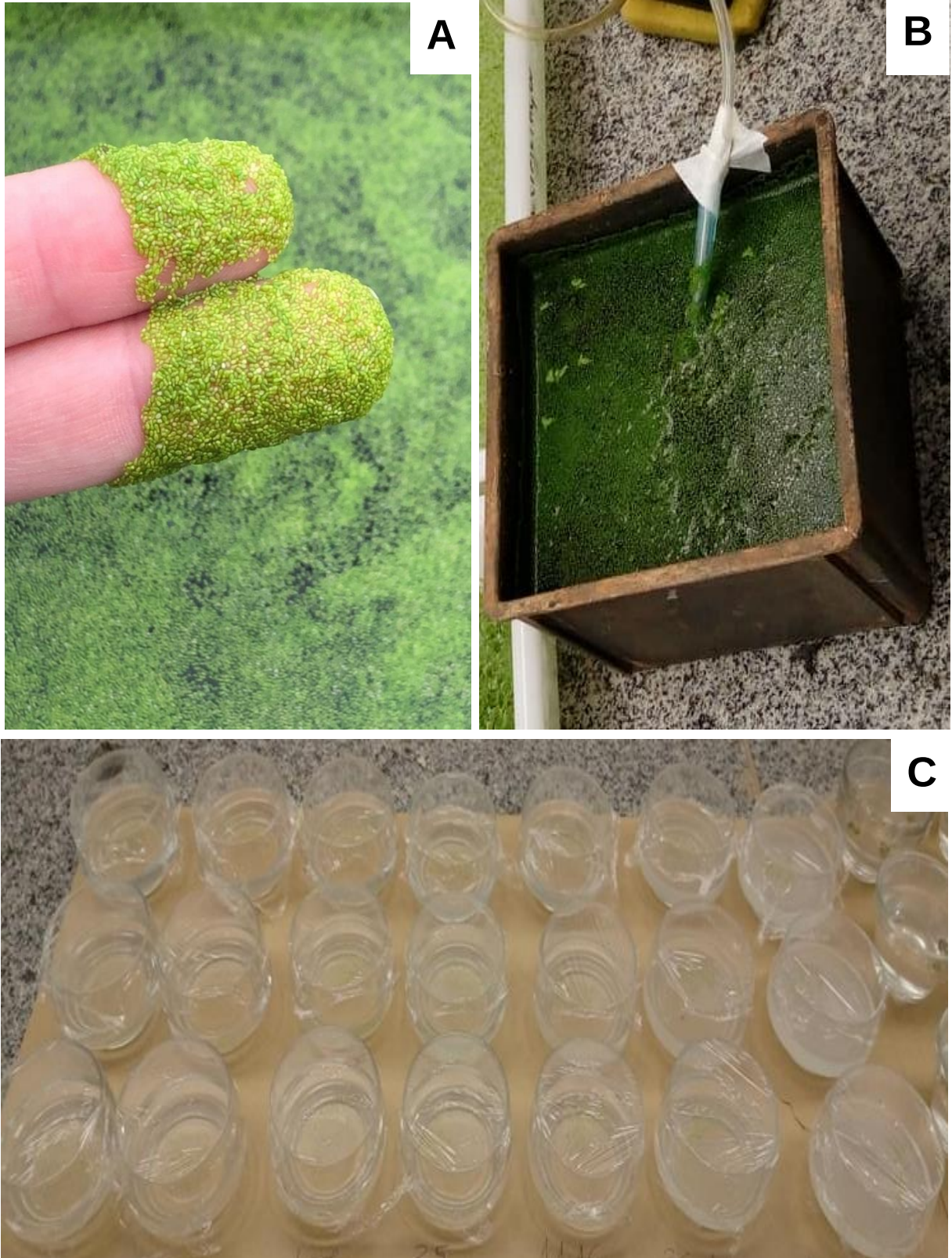
Fonte: Próprio autor.

Figura 5- Aspectos do cultivo e do ensaio de toxicidade com *Azolla caroliniana*. A) Frondes de *Azolla caroliniana*; B) Recipiente com *Azolla caroliniana* durante aclimação; C) Ensaio com *Azolla caroliniana* em triplicata



Fonte: Próprio autor.

Figura 6- Aspectos do cultivo e do ensaio de toxicidade com *Wolffia brasiliensis*.
A) Frondes de *Wolffia brasiliensis*; B) Recipiente com *Wolffia brasiliensis* durante aclimação; C) Ensaio com *Wolffia brasiliensis*. em triplicata



Fonte: Próprio autor.

5.3.2 Ensaio de toxicidade com caramujo (*Pomacea canaliculata*)

Os ensaios de toxicidade aguda para *Pomacea canaliculata* foram realizados de acordo com os procedimentos da ABNT NBR 15088: 2016 (ABNT, 2016) para peixes, adaptada para os ensaios com o caramujo garantindo a padronização dos resultados.

Foram utilizados caramujos com peso entre 0,75 e 1,30 g. Os caramujos foram previamente aclimatados por sete dias em sala de bioensaios à temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C, fotoperíodo de 12 horas, com aeração contínua e alimentados diariamente com a macrófitas submersas (*Hydrilla verticillata*) e ração extrusada.

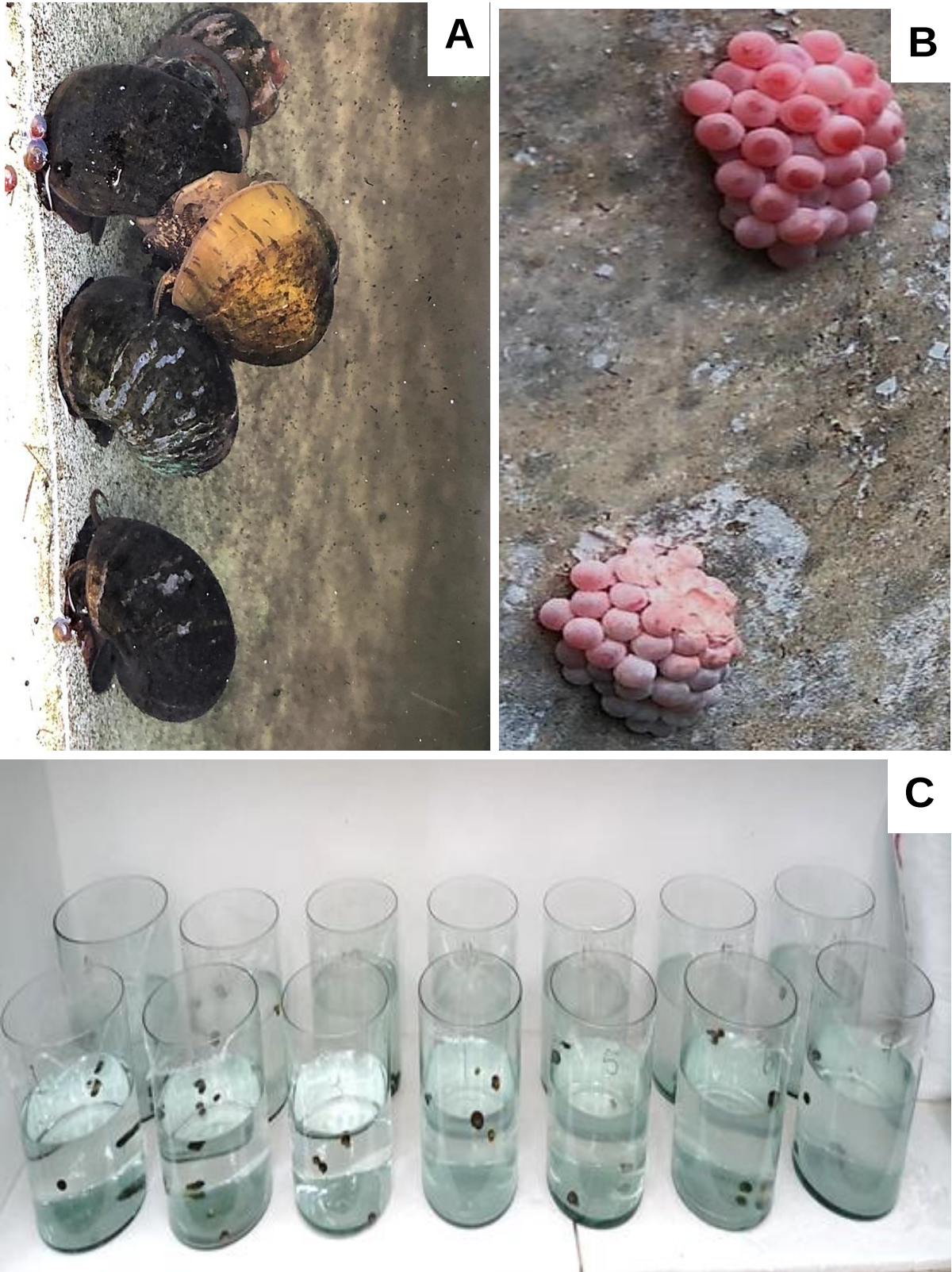
A sanidade e sensibilidade do lote de organismos foram avaliadas por meio de ensaio com cloreto de potássio como substância de referência. A concentração de cloreto de potássio que causa efeito em 50% dos indivíduos (CE50) em 48 horas para o caramujo foi de 1,63 mg. L⁻¹, com LS de 1,98 mg. L⁻¹ e LI de 1,34 mg. L⁻¹. Dessa forma, os organismos estavam em condições normais de sanidade e sensibilidade de acordo com a carta controle de outros lotes utilizados anteriormente no laboratório.

Após os ensaios com a substância de referência, foram realizados ensaios preliminares com clorpirifós, para determinar o intervalo de concentração que causa 0 e 100% de imobilidade/mortalidade no período de 48 horas. Para a avaliação de imobilidade e mortalidade, os caramujos eram estimulados uma única vez nos períodos de 24 e 48h após a exposição do clorpirifós, observando sua capacidade de mobilidade e respiração.

Após a determinação dos intervalos de concentração nos ensaios preliminares, foram realizados os ensaios definitivos. Utilizou-se três réplicas para cada concentração testada, com cinco caramujos por réplica, em sistema estático (sem troca de água) com duração de 48 horas e sem alimentação dos animais durante o período de exposição. Os caramujos foram submetidos ao ensaio definitivo nas concentrações de 2,80; 4,80; 8,20; 13,90; 23,70; 40,30 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Foi utilizado um grupo controle para cada repetição (Figura 7).

Os parâmetros físico-químicos de água: pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica, foram mensuradas em 0, 24 e 48 horas após exposição aos inseticidas com auxílio de uma sonda multiparâmetros *Profissional Plus*, de acordo com as normas estabelecidas pela ABNT NBR 15088: 2016 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS- ABNT, 2016).

Figura 7. A) Caramujos *Pomacea canaliculata* adultos; B) Ovos de *Pomacea canaliculata*; C) Recipientes teste com réplicas contendo caramujos por concentração do inseticida clorpirifós



Fonte: Próprio autor.

5.3.3 Ensaios de toxicidade com camarão Pitú (*Macrobrachium acanthurus*)

Os ensaios de toxicidade aguda para *Macrobrachium acanthurus* foram realizados de acordo com os procedimentos da ABNT NBR 15088: 2016 para peixes, adaptada para os ensaios com o camarão garantindo a padronização dos resultados (ABNT, 2016).

Os camarões foram criados em tanques com aeração e fluxo de água contínuo, alimentados com ração extrusada úmida. Foram utilizados camarões com peso entre 0,92 e 2,35 g. Não ocorreu aclimatação antes dos bioensaios, devido à natureza comportamental territorialista do *M. acanthurus*. A sanidade e sensibilidade do lote de organismos foram avaliadas por meio de ensaio com cloreto de potássio como substância de referência.

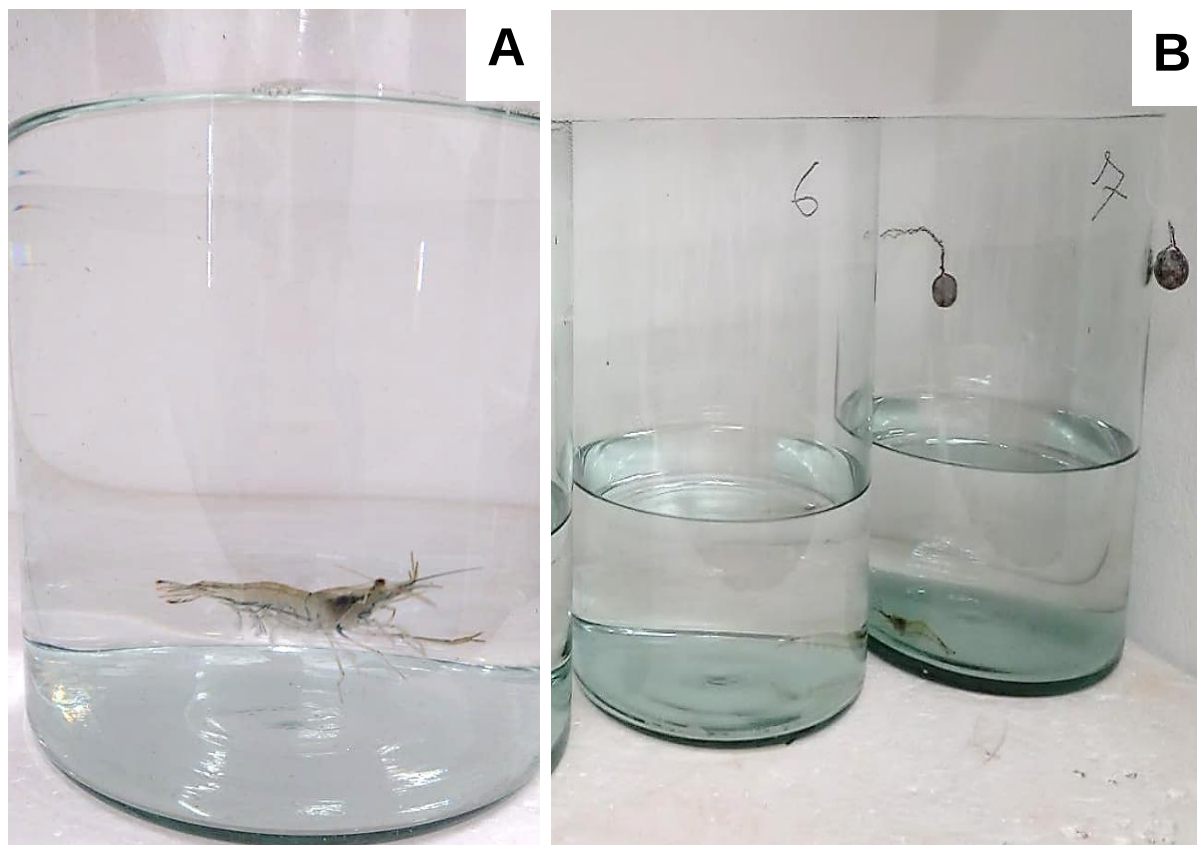
A CL50 do cloreto de potássio para o camarão após 48 horas de exposição foi de 1,53 mg. L⁻¹, com LS de 2,33 mg. L⁻¹ e LI de 1,00 mg. L⁻¹. Dessa forma, os organismos estavam em condições normais de sanidade e sensibilidade de acordo com a carta controle de outros lotes utilizados anteriormente no laboratório.

Após os ensaios com a substância de referência, os camarões foram submetidos à um ensaio preliminar estático em triplicata com clorpirifós, para determinar o intervalo de concentração que causa 0 e 100% de imobilidade/mortalidade no período de 48 horas.

Após a determinação dos intervalos de concentração nos ensaios preliminares, foram realizados os ensaios definitivos. Utilizou-se três réplicas para cada concentração testada, com um camarão por réplica, em sistema estático com duração de 48 horas, sem alimentação dos animais durante o período de exposição. Os camarões foram submetidos ao ensaio definitivo nas concentrações de 0,001; 0,004; 0,006; 0,008; 0,01 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Utilizou-se um grupo controle para cada repetição (Figura 8).

Os parâmetros físico-químicos de água: pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica, foram mensuradas em 0, 24 e 48 horas após exposição aos inseticidas com auxílio de uma sonda multiparâmetros *Profissional Plus*, de acordo com as normas estabelecidas pela ABNT NBR 15088: 2016 (ABNT, 2016).

Figura 8- A) Camarão *Macrobrachium acanthurus*; B) Recipientes teste com réplicas contendo o camarão por concentração do inseticida clorpirifós



Fonte: Próprio autor.

5.3.4 Ensaio de toxicidade aguda com os peixes Platy e Mato-grosso (*Xiphophorus maculatus* e *Hyphessobrycon eques*)

Os ensaios de toxicidade aguda para os peixes *X. maculatus* e *H. eques*, foram realizados de acordo com os procedimentos da ABNT NBR 15088 (2016). Para *X. maculatus* foram utilizados alevinos com peso entre 0,95 e 1,56 g., e alevinos com peso entre 1,11 e 2,00 g. para *H. eques* (ABNT, 2016).

Foram utilizados alevinos oriundos de piscicultura. Os alevinos foram previamente aclimatados por sete dias em sala de bioensaios à temperatura de $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas, com aeração contínua e alimentados diariamente com macrófitas submersas (*Lemna minor*) e ração extrusada (ABNT, 2016).

A sanidade e sensibilidade do lote de organismos foram avaliadas por meio de ensaio com cloreto de potássio como substância de referência. A CL50 do cloreto de potássio para *X. maculatus* foi de $1,33 \text{ mg. L}^{-1}$, com LS de $1,75 \text{ mg. L}^{-1}$ e LI de $1,14$

mg. L⁻¹, 1,40 mg. L⁻¹, e CL50;48h de 1,40 mg. L⁻¹ com LS de 1,68 mg. L⁻¹ e LI de 1,24 mg. L⁻¹ para *H. eques*. Dessa forma, os organismos estavam em condições normais de sanidade e sensibilidade de acordo com a carta controle de outros lotes utilizados anteriormente no laboratório.

Após os ensaios com a substância de referência, foram realizados ensaios preliminares com clorpirifós, para determinar o intervalo de concentração que causa 0 e 100% de imobilidade/mortalidade no período de 48 horas. Os peixes foram submetidos a um ensaio preliminar estático em triplicata.

Após a determinação dos intervalos de concentração nos ensaios preliminares, foram realizados os ensaios definitivos. Foi utilizado três réplicas para cada concentração testada, com três peixes por réplica, em sistema estático com duração de 48 horas, sem alimentação dos animais durante o período de exposição.

Os peixes da espécie *X. maculatus* foram submetidos ao ensaio definitivo nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00 mg. L⁻¹ de clorpirifós. A espécie *H. eques* foi submetida às concentrações de 0,50; 1,0; 2,0; 2,50; 3,00; 4,00 mg. L⁻¹ de clorpirifós.

Utilizou-se um grupo controle para cada repetição (Figura 9 e 10). Para a avaliação de imobilidade e mortalidade, os peixes foram observados nos períodos de 24 e 48h após a exposição do clorpirifós, retirando os indivíduos mortos e anotando os comportamentos durante o ensaio.

Os parâmetros físico-químicos de água: pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade elétrica, foram mensuradas em 0, 24 e 48 horas após exposição aos inseticidas com auxílio de uma sonda multiparâmetros *Professional Plus* de acordo com as normas estabelecidas pela ABNT NBR 15088: 2016 (ABNT, 2016).

Figura 9- A) Espécie adulta de *Xiphophorus maculatus*; B) Alevinos de *Xiphophorus maculatus* expostos ao clorpirifós; C) Recipientes teste com réplicas contendo *Xiphophorus maculatus* por concentração do inseticida



Fonte: LIVEAQUARIA, 2019.



Fonte: Próprio autor.

Figura 10- A) Alevinos de *Hyphessobrycon eques*; B) Aclimação de *Hyphessobrycon eques*; C) Recipientes teste com réplicas contendo *Hyphessobrycon eques* por concentração do clorpirifós



Fonte: Próprio autor.

5.4 CLASSIFICAÇÃO DOS INSETICIDAS PELA TOXICIDADE AGUDA

Com os valores encontrados de CI50, CE50 e CL50 para os organismos aquáticos não alvos estudados, o inseticida foi classificado quanto ao potencial tóxico de acordo com as classes de toxicidade aguda (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY- USEPA, 2017) (Tabela 1).

Tabela 1- Categorias para classificação ecotoxicológica dos valores de concentração letal 50% (CI/CL/CE50) para organismos não-alvos

CL 50% (mg L ⁻¹)	CATEGORIAS
< 0,1	Extremamente tóxico
0,1 – 1,0	Muito tóxico
1,0 – 10,0	Moderadamente tóxico
10,0 – 100,0	Pouco tóxico
> 100,0	Praticamente não-tóxico

Fonte: USEPA (2017).

5.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os valores das concentrações efetiva, de inibição e letal estimados (CE50, CI50 e CL50) foram calculados com o auxílio do *software Trimmed Spearman Karber* (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 TOXICIDADE AGUDA DO INSETICIDA PARA AS MACRÓFITAS (*L. MINOR*, *A. CAROLINIANA* E *W. BRASILIENSIS*)

A CI50 estimada no ensaio com clorpirifós para a macrófitas *L. minor*, *A. caroliniana* e *W. brasiliensis* foi de respectivamente 1299,6, 849,72 e 1271,63 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Com esse valor, o inseticida foi classificado como praticamente não tóxico de acordo com a classificação da USEPA (2017) (Tabela 2).

Tabela 2- Concentração de inibição estimada (CI50) do inseticida clorpirifós para macrófitas

Macrófitas	Limite Inferior	CI50 (mg. L ⁻¹)	Limite Superior	Equação Linear	R ²
<i>Lemna minor</i>	1170,2	1299,6	1443,31	$y = 5,7343x - 18,806$	$R^2 = 0,7481$
<i>Azolla caroliniana</i>	742,47	849,72	972,47	$y = 6,2349x - 11,219$	$R^2 = 0,9447$
<i>Wolffia brasiliensis</i>	1117,05	1271,63	1447,59	$y = 5,4857x - 13,629$	$R^2 = 0,833$

Fonte: Próprio autor.

Para a macrófita *L. minor*, no 3º dia de avaliação, foi observada clorose das frondes a partir da primeira concentração de 100,00 mg. L⁻¹ de clorpirifós. As primeiras frondes necróticas iniciaram no 3º dia de avaliação na concentração de 3.200,0 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Nas concentrações de 800,0 e 1.600,0 mg. L⁻¹, foi observada uma média de 33% de exemplares contendo clorose e necrose das frondes. No final do ensaio, a mortalidade ocasionada pela toxicidade do clorpirifós para *L. minor* foi observada em apenas 33% dos exemplares, e mortalidade de 100% na concentração de 3.200,0 mg. L⁻¹ de clorpirifós.

Para a *A. caroliniana*, no 3º dia de avaliação, observou-se clorose das frondes a partir da primeira concentração de 100,0 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Na concentração de 800,00 mg. L⁻¹ de clorpirifós, a média de frondes cloróticas e necróticas foram de 48%. No final do ensaio, a mortalidade ocasionada pela toxicidade do clorpirifós para *A. caroliniana* foi observada em 62% dos exemplares a partir da concentração de 1.600,0 mg. L⁻¹. A mortalidade de 100% dos exemplares foi observada no último dia de avaliação apenas na concentração de 3.200,0 mg. L⁻¹ de clorpirifós.

Para *W. brasiliensis*, no 3º dia de avaliação, observou-se clorose das frondes a partir da primeira concentração de 100,0 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Na concentração de 800,00 mg. L⁻¹, a média de frondes cloróticas e necróticas foram de 48%. A mortalidade em 51% das espécies ocorreu entre as concentrações de 800,0 e 1.600,0 mg. L⁻¹. No final do ensaio, a taxa máxima de mortalidade observada foi de 93% dos exemplares na concentração de 3.200,0 mg. L⁻¹ de clorpirifós.

O inseticida clorpirifós tem como função atuar no sistema nervoso de animais, inibindo a enzima acetilcolinesterase. Por não apresentar nenhum tipo de sistema ou impulso nervoso, os vegetais são afetados apenas por agrotóxicos do tipo herbicida, pois, estes possuem a função de inibir a capacidade da planta de realizar a fotossíntese (SANT'ANNA, 2009).

Na literatura, são poucas as pesquisas envolvendo plantas superiores como bioindicadores de clorpirifós. Bertrand *et al.* (2017), submeteram a planta aquática *Potamogeton pusillus*, espécie nativa de Portugal, à concentração ambiental de 0,0000000035 mg. L⁻¹ de clorpirifós em 96h de exposição. O estresse oxidativo foi evidenciado por uma ativação enzimática antioxidante e uma diminuição significativa no teor de pigmentos nas folhas.

O inseticida organofosforado Coumaphos induziu o estresse oxidativo e aumentou as defesas antioxidantes e de desintoxicação na macrófita da espécie *Ulva pertusa*. Concentrações de Coumaphos, acima de 0,01 mg. L⁻¹, causou um aumento acelerado nos níveis de proteínas carbonilas e hidroperóxidos lipídicos, atingindo o pico após 2 a 3 dias de exposição, seguidos por um rápido declínio nos dois marcadores do estresse oxidativo (SCHWEIKERT; BURRIT, 2012).

Bertrand *et al.* (2017), ressalta que devemos considerar que os compostos organofosforados são responsáveis por efeitos nos sistemas fotossintéticos, mas com concentrações de exposição mais elevadas do que as que foram avaliadas. Esses resultados chamam a atenção para a necessidade de mais estudos sobre efeitos de inseticidas em diferentes níveis biológicos em macrófitas aquáticas, especialmente em dose, uma vez que estes compostos são presentes e, provavelmente, os níveis não estaria preservando essas espécies.

6.2 TOXICIDADE AGUDA DO INSETICIDA PARA O CARAMUJO (*POMACEA CANALICULATA*)

A CE50 estimada do clorpirifós para *P. canaliculata* foi de 81,13 mg. L⁻¹ (Tabela 3), sendo o inseticida classificado como pouco tóxico de acordo com a classificação da USEPA (2017).

Tabela 3- Concentração de efeito estimada (CE50) do inseticida clorpirifós para caramujo

Caramujo	Limite Inferior	CE50 (mg. L ⁻¹)	Limite Superior	Equação Linear	R ²
<i>Pomacea canaliculata</i>	24,71	30,90	30,66	$y = 29,32x - 46,65$	R ² = 0,7115

Fonte: Próprio autor.

Após 24h de exposição ao clorpirifós, ocorreu a mortalidade de 87% dos exemplares na concentração de 40,30 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Após 48h de exposição, ocorreu a mortalidade de 13% dos exemplares na concentração de 23,70 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Após 48h foi observado a imobilidade/letargia de um único exemplar na concentração de 23,70 mg. L⁻¹ de clorpirifós.

Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados entre 24 e 48 horas de exposição ao clorpirifós. Os valores mensurados foram comparados entre o grupo controle e ao grupo contendo a concentração mais alta de clorpirifós (Quadro 3).

Quadro 3- Parâmetros de qualidade de água para o caramujo *Pomacea canaliculata*

Parâmetros de Qualidade de Água	Tempo de Exposição			
	24 horas		48 horas	
	Concentrações			
	Controle	40,30 mg. L ⁻¹	Controle	40,30 mg. L ⁻¹
Temperatura	22,60°C	23,00 °C	22,80°C	23,10 °C
Condutividade elétrica	98,30 µS.cm ⁻¹	99,50 µS.cm ⁻¹	103,50 µS.cm ⁻¹	112,70 µS.cm ⁻¹ 1
Oxigênio Dissolvido	5,26 mg. L ⁻¹	4,03 mg. L ⁻¹	4,00 mg. L ⁻¹	4,02 mg. L ⁻¹
pH	8,93	8,95	8,39	8,32

Fonte: Próprio autor.

Os valores dos parâmetros de qualidade de água mensurados durante a exposição do caramujo ao clorpirifós estavam de acordo o padrão estabelecido pela ABNT NBR (2016), para a validação do teste. O oxigênio mensurado não decaiu o limite de 4,00 mg. L⁻¹, temperatura de 23 à 27 °C com uma pequena queda no grupo controle e pH entre a faixa de 5,0 e 9,0.

Apesar da CE50 foi de 30,90 mg. L⁻¹ de clorpirifós, considerado como medianamente tóxico, Zhao e Chen (2016), também testaram a toxicidade do clorpirifós em *P. canaliculata*, registrando uma CE50 de 0,97 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Por se tratar da mesma espécie e do mesmo ingrediente ativo, espera-se que a diferença de letalidade se deve aos diferentes ingredientes inertes presentes nos inseticidas comercializados.

Em outras espécies de moluscos, Zhao e Chen (2016) avaliaram a toxicidade do clorpirifós nas espécies: *Aulacomya ater*, *Bulinus truncatus*, *Donax faba*, *Ischadium recurvum*, *Lampsilis siliquoidea*, *Lanistes carinatus* apresentando respectivamente a CE50% de 0,016, 1,32, 0,25, 0,96, 0,38 e 2,71 mg. L⁻¹ de clorpirifós.

Pesquisas foram realizadas com o organofosforado azinfos-metil no gastrópode de água doce da espécie *Chilina gibbosa*. Foi observado que a AchE é muito sensível ao azinfos-metil, apresentando CL50 de 0,002 mg. L⁻¹. As carboxilesterases não são inibidas em concentrações ambientais. O azinfos-metil

causa sinais de neurotoxicidade e aumenta a glutatona e a catalase (BIANCO, *et al.* 2013).

6.3 TOXICIDADE AGUDA DO INSETICIDA PARA O CAMARÃO PITÚ (*MACROBRACHIUM ACANTHURUS*)

A CL50 estimada no ensaio com clorpirifós para *M. acanthurus* foi de 0,0020 mg. L⁻¹. Com esse valor, o inseticida foi classificado como extremamente tóxico de acordo com a classificação dos Especialistas da Agência Ambiental dos Estados Unidos- USEPA (2017) (Tabela 4).

Tabela 4- Concentração letal estimada (CL50) do inseticida clorpirifós para o camarão Pitú (*Macrobrachium acanthurus*)

Camarão	Limite Inferior	CL50 (mg. L ⁻¹)	Limite Superior	Equação Linear	R ²
<i>Macrobrachium acanthurus</i>	0,0017	0,0020	0,0023	$y = 30x - 45.556$	R ² = 0,85

Fonte: Próprio autor.

Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados entre 0, 24 e 48 horas de exposição ao clorpirifós. Os valores mensurados foram comparados entre o grupo controle e ao grupo contendo a concentração mais alta de clorpirifós (Quadro 4).

Quadro 4- Parâmetros de qualidade de água para o camarão Pitú (*Macrobrachium acanthurus*)

Parâmetros de Qualidade de Água	Tempo de Exposição					
	0 horas		24 horas		48 horas	
	Concentrações					
	Controle	0,010 mg. L ⁻¹	Controle	0,010 mg. L ⁻¹	Controle	0,010 mg. L ⁻¹
Temperatura	26,3°C	26,0°C	27,0°C	-	26,3°C	-
Condutividade elétrica	150,6 μS.cm ⁻¹	148,5 μS.cm ⁻¹	152,0 μS.cm ⁻¹	-	152,5 μS.cm ⁻¹	-
Oxigênio Dissolvido	4,63 mg. L ⁻¹	4,61 mg. L ⁻¹	4,14 mg. L ⁻¹	-	3,98 mg. L ⁻¹	-
pH	8,64	8,62	8,84	-	8,83	-

Fonte: Próprio autor.

Os valores dos parâmetros de qualidade de água mensurados durante a exposição do camarão ao clorpirifós estavam de acordo o padrão estabelecido pela ABNT NBR (ABNT, 2016), para a validação do teste. O oxigênio estava acima de 4,00 mg. L⁻¹, tendo o grupo controle com o limite de oxigênio necessário em 48h de ensaio. Temperatura de 23 à 27 °C e pH entre a faixa de 5,0 e 9,0.

Em 24h de exposição, nas concentrações de 0,008 e 0,01 mg. L⁻¹ de clorpirifós, ocorreu 100% de mortalidade dos exemplares. Após 48h de exposição, na concentração de 0,001 mg. L⁻¹ de clorpirifós ocorreu a mortalidade de 33% dos exemplares e 100% de mortalidade nas concentrações de 0,004 e 0,006 mg. L⁻¹ de clorpirifós.

Na literatura, todas as espécies de crustáceos submetidos ao clorpirifós demonstraram sensibilidade à toxicidade do inseticida. Nos crustáceos do gênero *Daphnia sp.*, as espécies *Daphnia laevis*, *Daphnia magna* e *Daphnia ambigua* apresentaram CL50 de respectivamente 0,000216, 0.00005 e 0.000035 mg. L⁻¹ de clorpirifós (ZHAO; CHEN, 2016; FERRARIO *et al.* 2018; RAYMUNDO *et al.* 2019).

Na espécie *Astacus leptodactylus*, Banaee *et al.* (2019), notaram que na CL50% de 0,0046 mg. L⁻¹ de clorpirifós, fez com que o crustáceo apresentasse um desequilíbrio em sua homeostase celular. Zhao e Chen (2016), submeteram o camarão *Macrobrachium lar* a testes toxicológicos de clorpirifós, apresentando uma CL50% de 0,00096 mg. L⁻¹.

Pesquisas com o herbicida terbutilazina e o clorpirifós em microcosmos revelaram que a terbutilazina potencializou o efeito dos clorpirifós para o crustáceo *Daphnia magna*, presumivelmente desencadeando a transformação de clorpirifós em análogos de oxon mais tóxicos, nas concentrações de 0,0085 mg. L⁻¹ de Terbutilazina e 0,00017 mg. L⁻¹ de clorpirifós. As possíveis interações na cadeia alimentar resultantes de vários estressores químicos (PEREIRA; CEREJEIRA; DAAM, 2017).

Cientistas submeteram crustáceos do gênero *Daphnia*, conhecidas popularmente como pulgas-d'água, à exposição ao clorpirifós. As espécies *Daphnia ambigua*, *Daphnia carinata*, *Daphnia longispina*, *Daphnia magna* e *Daphnia pulex*, obtiveram CL50 de respectivamente: 0,000035, 0,00022, 0,00049, 0,0016 e 0,00046 mg. L⁻¹ de clorpirifós (ZHAO; CHEN, 2016).

Em crustáceos do gênero *Artemia*, Zhao e Chen (2016), submeteram as espécies *Artemia parthenogenetica*, *Artemia salina* e *Artemia sp.* em exposição ao clorpirifós obtendo a CL50 de 0,55, 0,53 e 0,14 mg. L⁻¹ de clorpirifós.

6.4 TOXICIDADE AGUDA DO INSETICIDA PARA OS PEIXES PLATY E MATO-GROSSO (*XIPHOPHORUS MACULATUS* E *HYPHESSOBRYCON EQUES*)

A CL50 estimada do clorpirifós para *X. maculatus* foi de 0,07 mg. L⁻¹. Para o peixe *H. eques*, a CL50;48h foi de 1,65 mg. L⁻¹. Com esses valores, o inseticida foi classificado como extremamente tóxico para *X. maculatus* e moderadamente tóxico para *H. eques* de acordo com a classificação da USEPA (2017) (Tabela 5).

Tabela 5- Concentração letal estimada (CL50) do inseticida clorpirifós para os peixes Platy e Mato-grosso (*Xiphophorus maculatus* e *Hyphessobrycon eques*)

Peixes	Limite Inferior	CL50 (mg. L ⁻¹)	Limite Superior	Equação Linear	R ²
<i>Xiphophorus maculatus</i>	0,03	0,07	0,16	y = 25,337x - 16,917	R ² = 0,9477
<i>Hyphessobrycon eques</i>	1,28	1,65	2,18	Y = 21,429x - 39,686	R ² = 0,8209

Fonte: Próprio autor

Após 24 horas de exposição, o peixe Platy (*Xiphophorus maculatus*), na concentração de 0,05 mg. L⁻¹ de clorpirifós, ocorreu a mortalidade de 33% dos exemplares. Nas concentrações de 0,10 e 0,50 mg. L⁻¹ de clorpirifós, ocorreu a mortalidade de respectivamente 55% e 89% dos exemplares.

Os exemplares que sobreviveram após 24h de exposição nas concentrações de 0,05 e 0,10 mg. L⁻¹ de clorpirifós, apresentaram letargia, natação errática e perda da capacidade de arfagem. Após 48h de exposição, ocorreu mortalidade de 44% dos exemplares na concentração de 0,05 mg. L⁻¹ de clorpirifós e mortalidade de 100% a partir da concentração de 0,50 mg. L⁻¹ de clorpirifós, devido a ação inibidora do clorpirifós as atividades do sistema nervoso do organismo.

Para a espécie de peixe Mato-grosso (*Hyphessobrycon eques*), após 24 horas de exposição, na concentração de 2,50 mg. L⁻¹ de clorpirifós ocorreu a mortalidade de 67% dos exemplares. Nas concentrações de 3,00 e 4,00 mg. L⁻¹ de clorpirifós ocorreu a mortalidade de respectivamente 67% e 55% dos exemplares.

Após 48 horas de exposição, na concentração de 2,00 mg. L⁻¹ de clorpirifós, ocorreu a mortalidade de 22% dos exemplares. Nas concentrações de 2,50 e 3,00 mg. L⁻¹ de clorpirifós, 100% dos exemplares estavam mortos. Em 4,00 mg. L⁻¹ de clorpirifós, apresentou mortalidade de 89%.

Nas concentrações de 0,50, 1,00 e 2,00 mg. L⁻¹ de clorpirifós, após 24 e 48h de exposição, os peixes sobreviventes apresentaram letargia, natação errática e perda da capacidade de arfagem. Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados entre 24 e 48 horas de exposição ao clorpirifós. Os valores mensurados

para os peixes Platy e Mato-grosso foram comparados entre o grupo controle e ao grupo contendo a concentração mais alta de clorpirifós (Quadro 5 e 6).

Quadro 5- Parâmetros de qualidade de água para o peixe Platy (*Xiphophorus maculatus*)

Parâmetros de Qualidade de Água	Tempo de Exposição			
	24 horas		48 horas	
	Concentrações			
	Controle	2,00 mg. L ⁻¹	Controle	2,00 mg. L ⁻¹
Temperatura	23,23 °C	23,10 °C	23,30 °C	-
Condutividade elétrica	93,6 µS.cm ⁻¹	95,0 µS.cm ⁻¹	95,6 µS.cm ⁻¹	-
Oxigênio Dissolvido	5,51 mg. L ⁻¹	4,54 mg. L ⁻¹	4,54 mg. L ⁻¹	-
pH	8,94	8,36	8,74	-

Fonte: Próprio autor.

Quadro 6- Parâmetros de qualidade de água para o peixe Mato-grosso (*Hyphessobrycon eques*)

Parâmetros de Qualidade de Água	Tempo de Exposição			
	24 horas		48 horas	
	Concentrações			
	Controle	4,00 mg. L ⁻¹	Controle	4,00 mg. L ⁻¹
Temperatura	23,23 °C	23,10 °C	24,10 °C	-
Condutividade elétrica	105,20 µS.cm ⁻¹	104,0 µS.cm ⁻¹	109,10 µS.cm ⁻¹	-
Oxigênio Dissolvido	8,65 mg. L ⁻¹	3,44 mg. L ⁻¹	8,73 mg. L ⁻¹	-
pH	8,94	8,34	8,72	-

Fonte: Próprio autor

Os valores dos parâmetros de qualidade de água mensurados durante a exposição do peixe *Platy* estavam de acordo o padrão estabelecido pela ABNT NBR (ABNT, 2016), para a validação do teste. O oxigênio estava acima de 4,00 mg. L⁻¹, temperatura de 23 à 27 °C e pH entre a faixa de 5,0 e 9,0.

Os valores dos parâmetros de qualidade de água mensurados durante a exposição do peixe *Mato-grosso* estavam de acordo o padrão estabelecido pela ABNT NBR (2016), para a validação do teste. O oxigênio estava abaixo de 4,00 mg. L⁻¹ após 24 horas de exposição ao clorpirifós. A temperatura de 23 à 27 °C e pH entre a faixa de 5,0 e 9,0 estavam de acordo com as normas estabelecidas.

Apesar do peixe *X. maculatus* ser considerado uma espécie exótica e adaptável em diferentes ecossistemas, sua CL50;48h foi de 0,07 mg. L⁻¹ de clorpirifós, diferente da espécie nativa *H. eques* que obteve CL50;48h de 1,65 mg. L⁻¹.

No peixe *Cyprinus carpio*, espécie resistente em viver em ambientes degradados, Yonar (2018), notou efeitos toxicológicos nas concentrações de 0,040 mg. L⁻¹. Nos peixes espinhosos da espécie *Gasterosteus aculeatus*, Marchand et al. (2017), notaram efeitos toxicológicos na concentração de 0,00088 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Em peixes neotropicais das espécies *Cheirodon interruptus* e *Cnesterodon decemmaculatus*, Bonifácio et al. (2017), constataram efeitos toxicológicos na concentração de 0,000084 mg. L⁻¹.

Zhao e Chen (2016), testaram o clorpirifós em diferentes espécies de peixes do gênero *Tilápia*: *Tilapia aurea*, *Tilapia guineenses*, *Tilapia sp.* e *Tilapia zillii*, e obtiveram a CL50 de respectivamente 0,41, 0,002, 1,77 e 0,073 mg. L⁻¹ de clorpirifós. Os peixes do gênero *Tilápia* são espécies importantes nas bacias hidrográficas brasileiras com grande valor comercial mostrando-se extremamente sensível a toxidade do clorpirifós.

6.5 CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE CLORPIRIFÓS EM ÁGUA DOCE E OS VALORES DE CI, CE E CL50 PARA OS BIOINDICADORES

Por não existir um limite máximo permitido para a concentração de clorpirifós para as cinco classes de águas doces estabelecidas pela Resolução CONAMA nº 357/2005, os resultados dos valores de CI, CE e CL50 dos organismos testados, foram comparados ao valor máximo estabelecido para clorpirifós em águas para consumo humano, segundo a Portaria de consolidação Nº 5 do Ministério da Saúde (2017).

Segundo o Ministério da Saúde (2011), a concentração máxima permitida para clorpirifós em água para abastecimento é de 0,030 mg. L⁻¹. De acordo com os

resultados desta pesquisa, consta-se que o valor da CL50 para o camarão *M. acanthurus* (0,0020 mg. L⁻¹) é inferior ao limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde (2017). Para os demais organismos de diferentes níveis tróficos avaliados, os valores de CI, CE e CL50 foram superiores ao valor estabelecido pelo Ministério da Saúde (2017).

7 CONCLUSÃO

Os organismos testados resultaram em diferentes respostas com relação à toxicidade do inseticida clorpirifós. Para as macrófitas *L. minor*, *A. caroliniana* e *W. brasiliensis*, o clorpirifós foi classificado como praticamente não tóxico.

Para o caramujo *P. canaliculata*, o clorpirifós foi considerado como pouco tóxico. Para a espécie de peixe nativo Mato-grosso (*H. eques*), o clorpirifós foi classificado como moderadamente tóxico. Para a espécie de peixe exótica Play (*X. maculatus*), e para o camarão Pitú (*M. acanthurus*), o inseticida foi classificado como extremamente tóxico.

Os parâmetros físicos e químicos de qualidade de água mensurados (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica), não apresentaram diferença de valores em comparação com as concentrações e os grupos controle, revelando que o clorpirifós é um inseticida que não altera os parâmetros de qualidade de água essenciais para a sobrevivência dos organismos.

Dentre os organismos testados, o camarão *M. acanthurus* é melhor bioindicador de contaminação de ambientes aquáticos por clorpirifós, sendo considerado como um organismo de fácil manuseio em laboratório e presente nas principais bacias hidrográficas do Brasil.

Sugere-se mais pesquisas com clorpirifós utilizando diferentes bioindicadores das quais são sugeridos nas normas técnicas. Realizar ensaios ecotoxicológicos combinando diferentes agrotóxicos são necessários, principalmente com a chegada de novos agrotóxicos no mercado brasileiro, pois, mesmo com ingredientes ativos já conhecidos, pesquisas comprovaram que os ingredientes inertes presentes nos produtos, pode causar diferentes efeitos em um mesmo organismo.

Ressalta-se a importância de haver futuras alterações de resoluções brasileiras que visam proteger as comunidades aquáticas dos limites de agrotóxicos permitidos em águas.

REFERÊNCIAS

ADEWUMI, B.; OGUNWOLE, G. A.; AKINGUNSOLA, E.; FALOPE, O. C.; ENIADE, A. Effects of sub-lethal toxicity of chlorpyrifos and DDforce pesticides on haematological parameters of *Clarias gariepinus*. **International Research Journal of Public and Environmental Health**, Abingdon, v. 5, n. 5, p. 62-71, 2018. Disponível em: <https://journalissues.org/wp-content/uploads/2018/06/Adewumi-et-al.pdf>. Acesso em 18 set. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS – ANA. **Indicadores de qualidade**. Brasília: ANA, 2019. Disponível em: <http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/panorama-das-aguas/qualidade-da-agua/indicadores-de-qualidade>. Acesso em: 17 abr. 2019.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Agrotóxico, herbicida e pesticida**. Brasília: ANVISA, 2018a. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2861541&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=agrotoxico-erbicida-e-pesticida&inheritRedirect=true. Acesso em: 12 dez. 2018.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Índice monográfico**. Brasília: ANVISA, 2018b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C20%2B%2BClorpirif%25C3%25B3s.pdf/f8ddca3d-4e17-4cea-a3d2-d8c5babe36ae>. Acesso em: 22 out. 2018.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada – Rdc Nº 226, De 28 De Setembro De 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_226_2004_COMP.pdf/c061fa71-eca6-42d6-bab6-9e722c1549d9. Acesso em: 22 out. 2018.

AGUINAGA, J. Y.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; IKEFUTI, C.; ORTEGA, G. G.; ETO, S. F.; CRUZ, C.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; FERNANDES, J. B. K. Acute toxicity and determination of the active constituents of aqueous extract of *Uncaria tomentosa* bark in *Hyphessobrycon eques*. **Journal of Toxicology**. Rockville, v. 2014, n. 3, p.1-5, 2014. Disponível em: <https://new.hindawi.com/journals/jt/2014/412437/>. Acesso em: 22 set. 2018.

ALBERTONI, E., F.; PALMA-SILVA, CLEBER; ESTEVES, F.; A. Distribution and growth in adults of *Macrobrachium acanthurus* Wiegmann, (Decapoda, Palaemonidae) in a tropical coastal lagoon, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 61-70, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81752002000600006. Acesso em: 11 fev. 2019.

ALFONSO, L. F.; GERMÁN, G. V.; CARMEN, P. C. M. DEL; HOSSEIN, G. Adsorption of organophosphorus pesticides in tropical soils: The case of karst

landscape of northwestern Yucatan. **Chemosphere**, Nova York, v. 166, n. 1, p. 292-199, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653516313108?via%3Dihub>. Acesso em: 13 mar. 2019.

ALI, Z.; WAHEED, H.; KAZI, A. G.; HAYAT, A.; AHMAD, M. Duckweed: An Efficient Hyperaccumulator of Heavy Metals in Water Bodies. In: AHMAD; P. (org.). **Plant metal interaction - emerging remediation techniques**. Índia: Elsevier, 2016. p. 411- 429. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128031582000163>. Acesso em: 13 mar. 2019.

ALMEIDA, D. A.; CAVENDISH, T. H.; BUENO, P. C.; ERVILHA, I. C.; GREGÓRIO, L. S. KANASHIRO, N. B. O; ROHLFS, D. B.; DO-CARMO-FARIA, T. F. A flexibilização da legislação brasileira de agrotóxicos e os riscos à saúde humana: análise do Projeto de Lei nº 3.200/2015. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 7, p. 7-11, 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2017000703001&script=sci_abstract&lng=pt. Acesso em: 14 mar. 2019.

APPENROTH, K. J., KRECH, K., KERESZTES, A., FISCHER, W., KOLOCZEK, H. Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. **Chemosphere**, Nova York, v. 78, n. 3, p. 216-223, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653509013307>. Acesso em 13 mar. 2019.

ARIAS, A. R. L., BUSS, D. S., ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M., EGLER, M., MUGNAI, R. BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.12, n. 1, p. 61-72, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S141381232007000100011&lng=en&nrm=iso&lng=pt. Acesso em: 15 mar. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 15088**: ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Rio de Janeiro, 2016. 23 p.

BAGLIANO, R. V. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 3-17, 2012. Disponível em: <https://www.uninter.com/revistameioambiente/index.php/meioAmbiente/article/view/113/50>. Acesso em: 24 ago. 2018.

BANAEI, M.; AKHLAGHI, M.; SOLTANIAN, S.; GHOLAMHOSSEINI, A.; HEIDARIEH, H.; FEREDOUNI, M. S. Acute exposure to chlorpyrifos and glyphosate induces changes in hemolymph biochemical parameters in the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Nova York, v. 222, n. 3, p. 145-155, 2019.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S153204561930095X>. Acesso em: 19 mar. 2019.

BARBOZA, H. T. G.; NASCIMENTO, X. P. R.; FREITAS-SILVA, O.; SOARES, A. G.; DA COSTA, J. B. N. Compostos organofosforados e seu papel na agricultura. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p.172-193, 2018. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/BarbozaNoPrelo.pdf>. Acesso em: 5 abr. 2019.

BARNHOORN, I.E.J., BORNMAN, M.S., JANSEN VAN RENSBURG, C., BOUWMAN, H. DDT residues in water, sediment, domestic and indigenous biota from a currently DDT-sprayed area. **Chemosphere**, Nova York, v. 58, n. 9, p. 1293-1299, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653509010169>. Acesso em: 16 abr. 2019.

BARTH, V. G.; BIAZON, A. C. B. Complicações decorrentes da intoxicação por organofosforados. **Sabios-Revista De Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 5, n. 2, p. 2-7, 2010. Disponível em: <http://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/566>. Acesso em: 27 mar. 2019.

BERTRAND, L., MAGDALENA, D. J. M., MONFERRÁN, V., AMÉA, M. V. Can a low concentration of an organophosphate insecticide cause negative effects on an aquatic macrophyte? Exposure of *Potamogeton pusillus* at environmentally relevant chlorpyrifos concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 138, n. 6, p. 139-147, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847217300746>. Acesso em: 30 ago. 2018.

BIANCO, K., YUSSEPPONE, M. S.; OTERO, S., OLIVERA, B. A., NAHABEDIAN, D., KRISTOFFAC, G. Resistance in cholinesterase activity after an acute and subchronic exposure to azinphos-methyl in the freshwater gastropod *Biomphalaria straminea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 109, n. 38, p. 85-92, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651314003583?via%3Dihub>. Acesso em: 22 ago. 2018.

BONIFACIO, F. A.; BALLESTEROSA, L. M.; BONANSE, I. R., FILIPPI, I.; AMÉ, V. M.; HUEDA, A. C. Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. **Chemosphere**, Nova York, v. 188, n. 156, p. 486-493, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517313656>. Acesso em: 12 ago. 2018.

BOTTÉ, E. S., JERRY, D. R., CODI KING, S., SMITH-KEUNE, C., NEGRI, A. P., Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. **Marine Pollution Bulletin**, Nova York, v. 65,

n. 4, p. 384-393, 2012. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X11004449>. Acesso em: 07 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Justiça. Lei nº 7.802, de 11 de julho 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm. Acesso em: 21 jan. 2019.

BRASIL. Senado Federal. Decreto nº 6.099, de 26 de abril de 2007. Aprova a estrutura regimental e o quadro demonstrativo dos cargos em comissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Seção 1, p. 2, 2007.

BRASIL. Senado Federal. Projeto de Lei nº 6299, de 2002. Altera os artigos 3º e 9º da lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=34818AAFA2DF6BA2DA56CFD16970F924.proposicoesWebExterno1?codteor=1654426&filenome=Tramitacao-PL+6299/2002. Acesso em: 15 abr. 2019.

BRASIL. Senado Federal. Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília (DF): Ministério do Meio Ambiente; 2005. p. 1-27.

BROGAN, W. R., RELYEA, R. A. Multiple mitigation mechanisms: Effects of submerged plants on the toxicity of nine insecticides to aquatic animals.

Environmental Pollution, Oxford, v. 220, n. parte A, p. 688-695, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749116317018>. Acesso em: 21 ago. 2018.

CACCIATORE, C. L., NEMIROVSKY, I. S., GUERRERO, V. R. N., COCHÓN, C. A. Azinphos-methyl and chlorpyrifos, alone or in a binary mixture, produce oxidative stress and lipid peroxidation in the freshwater gastropod *Planorbis corneus*.

Aquatic Toxicology, Nova York, v. 167, n. 9, p. 12-19, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X1530014X?via%3Dihub>. Acesso em 15 set. 2018.

CARVALHO, L. N.; PIVOTO, T. S. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônoma. **Revista Eletrônica do PPGEAmb-CCR/UFSM**, Santa

Maria, v. 2, n. 2, p. 176-192, 2011. Disponível em:
<https://periodicos.ufsm.br/remoa/article/view/2315>. Acesso em: 24 set. 2018.

CAVALIERE, M. J.; CALORE, E. E.; PEREZ, N. M.; PUGA, F. R. Miototoxicidade por organofosforados. **Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 267-72, 1996.
 Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S003489101996000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 03 set. 2018.

CENTNER, T. J. Cancelling pesticide registrations and revoking tolerances: The case of chlorpyrifos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 57, n. 9, p. 53–61, 2018. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668917303150>. Disponível em: 11 set. 2018.

CHEREMISINOFF, N. P., KING, J. A., Toxic properties of pesticides. **Journal of Contaminants Hydrology**, Nova York, v. 18, n. 8, p. 30-33, 1994.

CLÉMENT, B.; MERLIN, G.; The contribution of ammonia and alkalinity to landfill leachate toxicity to duckweed. **Science of The Total Environment**, Nova York, v. 170, n. 1, p. 71-79, 1995. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004896979504563G>. Acesso em: 07 set. 2018.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. **Mortandade de peixes**. São Paulo: Cetesb, 2019. Disponível em:
<https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/alteracoes-fisicas-e-quimicas/oxigenio-dissolvido/>. Acesso em: 25 abr. 2019.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T. GALLI, A. GARBELLINI, G. S. TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 15, n. 15, p. 65-72, 2005. Disponível em:
<https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/4469/3518>. Acesso em: 26 set. 2018.

CRUZ, C., SILVA, A. F., SHIOGIRI, N. S., GARLICH, N., PITELLIIMAZAPYR, R. A. Herbicide efficacy on floating macrophyte control and ecotoxicology for non-target organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Viçosa, v. 131, n. 1, p. 135-142, 2016. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582015000100103. Acesso em: 17 set. 2018.

DARRIGRAN, G.; DAMBORENEA, C.; TAMBUSI, A. *Pomacea canaliculata* (Mollusca, Gastropoda) na Patagônia: potencial papel das mudanças climáticas em sua dispersão e assentamento. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, p. 8-13, 2011. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842011000100004. Acesso em: 17 set. 2018.

DE-ARAÚJO, M. C.; De ASSIS, C. R. D.; SILVA, K. C. C.; De SOUZA, K. S.; De AZEVEDO, R. S.; ALVES, M. H. M. E.; DA-SILVA, L. C.; Da SILVA, V. L.; ADAM, M.L.; DE-CARVALHO-JUNIOR, L. B.; De SOUZA-BEZERRA, R.; De OLIVEIRA, M. B. M. Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring. **Aquatic Toxicology**, Nova York, v. 205, n. 17, p. 213-226, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X18307914?via%3Dihub>. Acesso em: 30 set. 2018.

DE-SILVA, P. M. C. S., SAMAYAWARDHENA, L. A. Effects of chlorpyrifos on reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulata*). **Chemosphere**, Nova York, v. 58, n. 9, p.1289-1293, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653504009919?via%3Dihub>. Acesso em: 2 out. 2018.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO – DOU. Ato nº 42, de 19 de junho de 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/web/dou/-/ato-n-42-de-19-de-junho-de-2019-167261071>. Acesso em: 14 dez. 2019.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 9, n.1, p. 1-18, 1999. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/39598>. Acesso em: 26 ago. 2018.

ELERŠEK, T.; FILIPI, M. Pesticides - the impacts of pesticides exposure. In: Stoytcheva, M. (org.). Pesticides: the impacts of pesticides exposure. Rijeka-Croácia; Intechopen, 2011. p. 244-256. Disponível em: <http://library.umac.mo/ebooks/b28109776.pdf>. Acesso em: 13 set. 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Perdas de agrotóxicos**. Brasília: Embrapa, 2018. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_39_210200792814.html. Acesso em: 17 dez. 2018.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. **Risk assessment guidance for superfund: part A, process for conducting probabilistic risk assessment**. Whashington; EPA, 2015, v. 3, p. 4 -30. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/rags3adt_complete.pdf. Acesso em: 18 set. 2019.

FERRARIO, C.; PAROLINI, M.; DE-FELICE, B.; VILLA, S.; FINIZIO, A.; Linking sub-individual and supra-individual effects in *Daphnia magna* exposed to sub-lethal concentration of chlorpyrifos. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 235, n. 113, p. 411-418, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117342720?via%3Dihub>. Acesso em: 9 out. 2018.

FLASKOS, J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. **Toxicology letters**, Amsterdam, v. 209, n. 1, p. 86–93, 2012.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427411016365?via%3Dihub>. Disponível em: 29 set. 2018.

FRANZ, A.; LINK, D. Um olhar sobre a utilização de agrotóxicos no município de Novo Barreiro/RS, através do projeto de educação ambiental, aplicado nas séries finas do ensino fundamental na escola municipal de ensino fundamental Zeferino Brasil. **Monografias Ambientais**, Santa Maria, v. 4, n. 4, p. 672-695, 2011.

Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/remoa/article/view/3931>. Acesso: 14 out. 2018.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. [S.l.: s.n.], 2007. Disponível em: <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 6 dez. 2018.

GASCA-LEYVA, J., F., E.; MARTINEZ-PALACIOS, C., A.; ROSS, L., G. The respiratory requirements of *Macrobrachium acanthurus* (Weigman) at different temperatures and salinities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 93, n. 2, p. 191-197, 1991.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004484869190217U>. Acesso em: 30 out. 2018.

GHESQUIERE, S. Channeled apple snail. **Aquatic invasive species**, Reston, 2005, p. 1-3. Disponível em: http://www.in.gov/dnr/files/CHANNELED_APPLE_SNAIL.pdf. Acesso em: 25 nov. 2018.

GODOY, R. C. B.; OLIVEIRA, M. I. Agrotóxicos no Brasil: processo de registro, riscos à Saúde e programas de monitoramento. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA**, Brasília, v. 134, n. 1, p. 2004. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/653905/1/documento134.pdf>. Acesso em: 17 set. 2018.

GOKTEPE, I.; PORTIER, R.; AHMEDNA, M. Ecological risk assessment of Neem-based pesticides. **Journal of Environmental Science Health Part B**, Filadélfia, v. 39, n. 2, p. 311-320, 2004. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15132337>. Acesso em: 14 ago. 2018.

HAMILTON M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays.

Environmental Science & Technology, Washington, v.11, n. 7, p.714–719, 1977.

Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es60130a004>. Acesso em: 05 jul. 2018.

HATAMI, M.; BANAEI, M.; HAGHI, B. N. Sub-lethal toxicity of chlorpyrifos alone and in combination with polyethylene glycol to common carp (*Cyprinus carpio*).

Chemosphere, Nova York, v. 219, n. 77, p. 981-988, 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518323993?via%3Dihub>. Acesso em: 22 out. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS- IBAMA. **Avaliação ambiental para registro de agrotóxicos, seus componentes e afins de uso agrícola**. Brasília: IBAMA, 2016. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/avaliacao-e-destinacao/quimicos-e-biologicos/avaliacao-ambiental-para-registro-de-agrotoxicos-seus-componentes-e-afins-de-uso-agricola>. Acesso em: 29 nov. 2018.

JACQUIN, L.; GANDAR, A.; AGUIRRE-SMITH, M.; PERRAULT, A.; LE HÉNAFF, M.; DE JONG, L.; PARIS-PALACIOS, S.; LAFFAILLE, P.; JEAN, S. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 172, n. 15, p. 255-264, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651319301125>. Acesso em: 30 ago. 2018.

KISS, I.; KOVÁTS, N.; SZALAY, T. Evaluation of some alternative guideline for risk assessment of various habitats. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 140, n. 11, p.411-417, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427403000377?via%3Dihub>. Acesso em: 12 nov. 2018.

LANDRIGAN, P. J.; LAMBERTINI, L.; BIRNBAUM, L. S. A Research strategy to discover the environmental causes of autism and neurodevelopmental disabilities. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v. 120, n. 7, p. 258-260, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3404655/>. Acesso em: 15 nov. 2018.

LIVEAQUARIA. **Rhineland**: Air Park Road. [S.l.: s.n.], 2019. Disponível em: <https://www.liveaquaria.com/product/2728/?pcatid=2728>. Acesso em: 10 out. 2019.

LIVINGSTONE, D. R. Persistent pollutants in marine invertebrates. In: WALKER, C. H. LIVINGSTONE, D.R. **Persistent pollutants in marine ecosystems**. Oxford: Pergamon,1992. p. 3-34.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Notícias**. Brasília: MAPA, 2019a. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/ranking-da-fao-mostra-que-uso-de-defensivos-no-brasil-e-menor-que-em-diversos-paises-da-europa>. Acesso em: 15 dez. 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Notícias**. Brasília: MAPA, 2019b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/diario-oficial-traz-registro-de-42-defensivos-agricolas-objetivo-e-aumentar-concorrencia-e-baratear-custo-dos-produtos>. Acesso em: 15 dez. 2019.

MARCHAND, A.; PORCHERA, M. G.; TURIESA, C.; CHADILIA, E.; PALLUELA, O.; BAUDOINA, P.; BETOULLE, S.; NILLESA, A. B. Evaluation of chlorpyrifos effects, alone and combined with lipopolysaccharide stress, on DNA integrity and immune responses of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 145, n. 25, p. 333-339, 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651317304402?via%3Di> hub. Acesso em: 21 jul. 2018.

MARIGOUDAR, S. R.; MOHAN, D.; NAGARJUNA, A. KARTHIKEYAN, P. Biomarker and histopathological responses of *Lates calcarifer* on exposure to sub lethal concentrations of chlorpyrifos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v.148, n. 26 , p. 327-335, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651317306978?via%3Di> hub. Acesso em: 17 set. 2018.

MELO, R. F. de; BRITO, L. T. L.; GIONGO, V.; ANGELOTTI, F.; MIGUEL, A. A. Pesticidas e seus impactos no ambiente. In.: BRITO, L. T. L.; MELO, R. F.; GIONGO, V. (ed.). **Impactos ambientais causados pela agricultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. cap. 4, p. 101-136. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/875500>. Acesso em: 25 jan. 2019.

MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v. 3, n. 3, p. 1-6, 2002. Disponível em: http://taquari.emater.tche.br/docs/agroeco/revista/ano3_n4/artigo2.pdf. Acesso em: 4 nov. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 5, de 12 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>. Acesso em: 9 out. de 2019.

MOREIRA, J. C.; PERES, F.; SIMÕES, A. C.; PIGNATI, W. A.; DORES, E. C.; VIEIRA, S. N.; STRÜSSMANN, C.; MOTT, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 1557-1568, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1413-81232012000600019&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 27 set. 2018.

MOSQUIN, P. L.; ALDWORTH, J.; POLETIKA, N. N. Peak centiles of chlorpyrifos surface-water concentrations in the NAWQA and NASQAN programs. **Water Research**, Nova York, v. 69, n. 1, p. 261-273, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135414007908?via%3Di> hub. Acesso em: 21 out. 2018.

NAIGAGA, I.; KAISER, H.; MULLER, W.J.; OJOK, L; MBABAZI, D.; MAGEZI, G.; MUHUMUZA, E. Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: a case study in Lake Victoria wetlands, Uganda. **Physics and Chemistry of the Earth**, Oxford, v. 36, n. 14, p. 918-928, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474706511001823>. Acesso em: 11 set. 2018.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PONTES-NETTO, D.; FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 201-204, 2007. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0101-20612007000100035&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 13 nov. 2018.

OGBEIDE, O.; TONGO, I.; EZEMONYE, L. Assessing the distribution and human health risk of organochlorine pesticide residues in sediments from selected rivers. **Chemosphere**, Nova York, v.144, n. 108, p.1319-1326, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653515301880>. Acesso em: 29 dez. 2018.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. *Lemna* sp. growth inhibition test. In: GUIDELINE for testing of chemicals. Paris: OECD, 2002.

ORUÇ, E. O. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p.160-166, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048357509001527>. Acesso em: 19 set. 2018.

OUROFINO AGROCIÊNCIA. **CapatazBR**. Uberaba: Ouro Fino Química, 2018. Disponível em: <https://www.ourofinoagro.com.br/produtos/capatazbr/>. Acesso em: 22 set. 2018.

PEREIRA, C. D. S.; MARANHO, L. A.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, D. A.; CESAR, A.; GUIMARÃES, L. L. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, Nova York, v. 549, n. 1, p. 148–154, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716300511>. Acesso em: 13 jan. 2019.

PEREIRA, A. S.; CEREJEIRA, M. J.; DAAM, M. A. Toxicity of environmentally realistic concentrations of chlorpyrifos and terbuthylazine in indoor microcosms. **Chemosphere**, Nova York, v. 182, n. 32, p. 348-355, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517307270>. Acesso em: 13 dez. 2018.

PEREIRA, S. F.; POTT, V. J.; TEMPONI, L. G. Lemnoideae (Araceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 3, p. 839-848, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602016000300839. Acesso em: 11 nov. 2018.

PEREZ, N. M.; CALORE, E. E.; VILELA-DE-ALMEIDA, L.; NARCISO, E. S.; PUGA, F. R. Aspectos morfológicos e morfométricos do cérebro de ratos na intoxicação crônica pelo organofosforado metamidofós. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São

Paulo, v. 65, n. 1, p. 50-53, 2006. Disponível em:
http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552006000100010&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 16 nov. 2018.

PESTICIDE PROPERTIES DATA BASE – PPDB, **Properties of chlorpyrifos**. Hertfordshire: Agriculture and Environment Research Unit, 2018. Disponível em:
<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>. Acesso em: 28 set. 2018.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; LARA, S. S. CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232017021003281&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 15 dez. 2018.

POSSAVATZ, J.; ZEILHOFER, P.; PINTO, A. A.; TIVES, A. L.; DORES, E. F. G. C. Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 9, n. 1, p. 8-14, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1980-993X2014000100009&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 18 nov. 2018.

PRODOCIMO, V.; FREIRE, C. A. Critical thermal maxima and minima of the platyfish *Xiphophorus maculatus* Günther (Poeciliidae, Cyprinodontiformes): a tropical species of ornamental freshwater fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 97-106, 2001. Acesso em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81752001000500007. Disponível em: 28 set. 2018.

QUEIROZ, J. F.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; NASCIMENTO, V. M. C. Organismos bentônicos bioindicadores da qualidade das águas da bacia do médio São Francisco. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2000. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/download/LibroBentonicos.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2019.

RAYMUNDO, L. B.; ROCHA, O.; MOREIRA, R. A.; MIGUEL, M.; DAAM, M. A. Sensitivity of tropical cladocerans to chlorpyrifos and other insecticides as compared to their temperate counterparts. **Chemosphere**, Nova York, v. 220, n. 6, p. 937-942, 2019. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653519300050>. Acesso em: 14 jan. 2019.

REBELO, R., M.; CALDAS, E., D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 7, p. 1199-1208, 2014. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000700016. Acesso em: 10 jan. 2019.

RIVADENEIRA, P. R.; AGRELO, M.; OTERO, S.; KRISTOFF, G. Different effects of subchronic exposure to low concentrations of the organophosphate insecticide chlorpyrifos in a freshwater gastropod. **Ecotoxicology and Environmental Safety**,

Nova York, v. 90, n. 1, p. 82-88, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651312004745>. Acesso em: 10 jan. 2019.

RUSCHEL, A. P. A Azolla e a cultura arrozeira. **Embrapa-CNPAP**, Goiânia, v. 1, n. 25, p. 1-16. 1990. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/192310/a-azolla-e-a-cultura-arrozadeira>. Acesso em: 31 mar. 2018.

SANTANA, C. A.; TONDATO, K. K.; SUAREZ, Y. R. Reproductive biology of *Hypessobrycon eques* (Characiformes: Characidae) in Southern Pantanal, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 79, n. 1, p. 70-79, 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-69842018005008102&script=sci_abstract. Acesso em: 22 jan. 2019.

SANT'ANNA, F. B. Principais mecanismos que ocasionam a resistência de insetos a inseticidas. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v. 3, n. 2, p. 8-17, 2009. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/material/Santana33wf.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2019.

SANTOS, V. M. R., DONNICI, C. L., DA COSTA, J. B. N., CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de Preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000100028. Acesso em: 17 jan. 2019.

SAWICKIA, K.; CZAJKAA, M.; KUCHARKA, M. M.; KRUSZEWSKI, M.; SKAWIŃSKIA, W.; BRZÓSKA, K.; KAPKA-SKRZYPCZAK, L. Chlorpyrifos stimulates expression of vitamin D3 receptor in skin cells irradiated with UVB. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 154, n. 10, p. 17-22, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048357518305212>. Acesso em: 17 jan. 2019.

SERRA, L. S.; MENDES, M. R. F.; SOARES, M. V. A. S.; MONTEIRO, I. P. Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. **Revista Científica do Centro de Estudos em Desenvolvimento Sustentável da UNDB**, São Luís, v. 1, n. 4, p. 18-24, 2016. Disponível em: http://professor.pucgoias.edu.br/sitedocente/admin/arquivosUpload/6461/material/revolu%C3%A7%C3%A3o_verde_e_agrot%C3%B3xicos_-_marcela_ruy_f%C3%A9lix.pdf. Acesso em: 18 jan. 2019.

SHAPIRO, G. D.; DODDS, L.; ARBUCKLE, T. E.; ASHLEY-MARTIN, J.; ETTINGER, A. S.; FISHER, M.; TABACK, S.; BOUCHARD, M. F.; MONNIER, P.; DALLAIRE, R.; MORISSET, A.-S.; FRASER, W. Exposure to organophosphorus and organochlorine pesticides, perfluoroalkyl substances, and polychlorinated biphenyls in pregnancy and the association with impaired glucose tolerance and gestational diabetes mellitus: The MIREC Study. **Environmental Research**, Boulder, v. 147, n. 40, p. 71-81, 2016. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935116300391?via%3Dihub>. Acesso em: 11 jan. 2019.

SILVA-DE-SÁ, R. J.; SOUZA, A. G. S.; JESUS, E. S.; JÚNIOR, A. P. Indicadores biológicos de qualidade da água e as mudanças climáticas Biological indicators of water quality and climate changes. **Multidisciplinary Reviews**, Lisboa, v. 2, n. 1, p. 3-9, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/332246821_Indicadores_biologicos_de_qualidade_da_agua_e_as_mudancas_climaticas_Biological_indicators_of_water_quality_and_climate_changes. Acesso em: 13 out. 2018.

SILVA, E.; CEREJEIRA, M. J. Avaliação do risco de pesticidas individuais e suas misturas em águas de superfície. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 2, p. 32-42, 2014. Disponível em: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2012000200003. Acesso em: 03 out. 2018.

SCHWEIKERT, K.; BURRITT, D. J. The organophosphate insecticide Coumaphos induces oxidative stress and increases antioxidant and detoxification defences in the green macroalgae *Ulva pertusa*. **Aquatic Toxicology**, Nova York, v. 122-123, n. 15, p. 86 - 92, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X12001750?via%3Dihub>. Acesso em: 23 out. 2018.

SOLE, M.; BONSIGNORE, M.; RIVERA-INGRAHAMB, G.; FREITAS, R. Exploring alternative biomarkers of pesticide pollution in clams. **Marine Pollution Bulletin**, Nova York, v. 136, n. 62, p. 61-67, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X18306349>. Acesso em: 02 dez. 2018.

SPADOTTO, C., A. Avaliação de riscos ambientais do uso de defensivos agrícolas para a qualidade da água. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 1-11, 2009. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/659081/avaliacao-de-riscos-ambientais-do-uso-de-defensivos-agricolas-para-a-qualidade-da-agua>. Acesso em: 12 dez. 2018.

SUMON, K. A.; RASHID, H.; PEETERS, E. T. H. M.; BOSMA, B. H.; VAN DEN BRINK, P. J. Environmental monitoring and risk assessment of organophosphate pesticides in aquatic ecosystems of north-west Bangladesh. **Chemosphere**, Nova York, v. 206, n. 167, p. 92-100, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518308221>. Acesso em: 7 ago. 2018.

TRIASSI, M.; NARDONE, A.; GIOVINETTI, M. C.; DE-ROSA, E.; CANZANELLA, S.; SARNACCHIARO, P.; MONTUORI, P. Ecological risk and estimates of organophosphate pesticides loads into the Central Mediterranean Sea from Volturno River, the river of the “Land of Fires” area, southern Italy. **Science of The Total Environment**, Dordrecht, v. 678, n. 15, p. 741-754, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719317310?via%3Dihub>. Acesso em: 10 dez. 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. **Technical overview of ecological risk assessment**: analysis phase: ecological effects characterization. Washington: USEPA, 2017. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>. Acesso em: 20 out. 2019.

VALENTI, W., C.; MELO, J., T., C.; LOBÃO, V., A.; Fecundidade em *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 9-15, 1989. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81751989000100002. Acesso em: 26 set. 2018.

VASCONCELOS, Y. Agrotóxicos na berlinda. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, v. 271, n. 18, p. 1-4, 2018. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2018/09/18/agrotoxicos-na-berlinda/>. Acesso em: 1 set. 2018.

VENTURA, C.; ZAPPIA, C. D.; LASAGNA, M.; PAVICIC, W.; RICHARD, S.; BOLZAN, A. D.; MONCZOR, F.; NÚÑEZ, F.; COCCA, C. Effects of the pesticide chlorpyrifos on breast cancer disease. Implication of epigenetic mechanisms. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 186, n. 21, p. 96-104, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960076018301870>. Acesso em: 12 jan. 2019.

VERHEYEN, J.; STOKS, R. Current and future daily temperature fluctuations make a pesticide more toxic: Contrasting effects on life history and physiology. **Environmental Pollution**, Barking, v. 248, n. 22, p. 209-218, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749118348073>. Acesso em: 16 jan. 2019.

VRYZAS, Z. Pesticide fate in soil-sediment-water environment in relation to contamination preventing actions. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 5–9, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468584417300454>. Acesso em: 30 jan. 2019.

VERA, R.; INSA, S.; FONTÀS, C.; ANTICÓ, E. A new extraction phase based on a polymer inclusion membrane for the detection of chlorpyrifos, diazinon and cyprodinil in natural water samples. **Talanta**, Nova York, v.185, n. 1, p. 291–298, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914018302960>. Acesso em: 23 nov. 2018.

VIDAL, S. P. **Determinação da inibição da acetilcolinesterase nas águas de poços e superficiais no assentamento zumbi dos palmares por agrotóxicos organofosforados**. 2011. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2011. Disponível em:

http://ead.uenf.br/moodle/pluginfile.php/5575/mod_resource/content/1/Samira_da_Penha_Vidal_-_Monografia_-_abril_1_.pdf. Acesso em: 19 mar. 2019.

WAUCHOPE, R. D., JOHNSON, W. C., SUMNER, H. R. Foliar and soil deposition of pesticide sprays in peanuts and their washoff and runoff under simulated worstcase rainfall conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vigo, v. 52, n. 23, p. 7056–7063, 2004. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf049283v>. Acesso em: 30 jan. 2019.

YONAR, E. M. Chlorpyrifos-induced biochemical changes in *Cyprinus carpio*: Ameliorative effect of curcumin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v.151, n. 30, p. 49-54, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651317309090?via%3Dihub>. Acesso em: 19 jan. 2019.

ZHAO, J.; CHEN, B.; Species sensitivity distribution for chlorpyrifos to aquatic organisms: Model choice and sample size. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v.125, n. 39, p. 161–169, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651315301883>. Acesso em: 13 fev. 2019.