



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
ICTA – INSTITUTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIAS DAS ÁGUAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIELA ANDRESSA FERREIRA VIANA

EFEITOS COMPORTAMENTAIS EM JUVENIS DE TAMBACUI (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) SUBMETIDOS AO PESTICIDA CLORPIRIFÓS

SANTARÉM - PARÁ

2023

DANIELA ANDRESSA FERREIRA VIANA

EFEITOS COMPORTAMENTAIS EM JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) SUBMETIDOS AO PESTICIDA CLORPIRIFÓS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção de grau de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Oeste do Pará. Instituto de Ciências e Tecnológica das Águas.

Orientador: Dr. Maxwell Barbosa de Santana

Co-orientadora: Dra. Elenn Suzany Pereira Aranha

SANTARÉM – PARÁ
2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- V614e Viana, Daniela Andressa Ferreira
Efeitos comportamentais em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) submetidos ao pesticida clorpirifós./ Daniela Andressa Ferreira Viana. – Santarém, 2023.
37 p. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Maxwell Barbosa de Santana.
Coorientadora: Elenn Suzany Pereira Aranha.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Tecnologia e Ciências das Águas, Bacharelado em Ciências Biológicas.
1. Pesticida. 2. Clorpirifós. 3. Peixe. I. Santana, Maxwell Barbosa de, *orient.* II. Aranha, Elenn Suzany Pereira, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 639.31

DANIELA ANDRESSA FERREIRA VIANA

EFEITOS COMPORTAMENTAIS EM JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) SUBMETIDOS AO PESTICIDA CLORPIRIFÓS

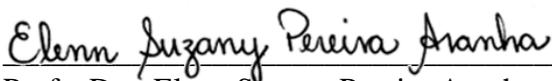
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção de grau de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Oeste do Pará. Instituto de Ciências e Tecnológica das Águas.

Conceito: 9,05

Data de Aprovação: 19/01/2023



Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana - Orientador
Universidade Federal do Oeste do Pará



Profa. Dra. Elenn Suzany Pereira Aranha – Co-orientadora
Universidade Federal do Oeste do Pará



Prof. Dr. Ezequias Procópio Brito
Universidade Federal do Oeste do Pará



Profa. Ma. Regiane Gabriele Rocha Vidal
Universidade Federal do Oeste do Pará

**Santarém – Pará
2023**

À minha família que me apoio e incentivo todo o caminho.

“Para tudo e por tudo, sempre”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por me apoiarem durante esses longos anos, por me incentivarem a continuar e por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais estressantes e animados. Sempre estão em minha vida, são os alicerces da minha vida. Muito, muito, muito obrigada.

Agradeço ao Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana por toda a orientação e conhecimento compartilhado. E espero continuar recebendo seu aprendizado. Muito obrigada!

Agradeço a Soraia Baia Santos, que compartilhou comigo seus conhecimentos e me proporcionou minha primeira experiência em laboratório com a linha de pesquisa que atuo. Muito obrigada!

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Elenn Suzany Pereira Aranha por me orientar nesses momentos mais estressantes e por compartilhar seus conhecimentos comigo. Muito obrigada!

Agradeço às técnicas do laboratório de Toxicologia, Jandira Oliveira e Mila Canto, por terem me acolhido e oferecido apoio durante as atividades. Muito Obrigada!

Agradeço ao João David Lisbôa por compartilhar seu conhecimento e aprendizados. Muito Obrigada!

Agradeço às meninas, em especial à Nataniely Pimentel, Rafaela Moda dos Santos e Cláudia Barrozo. Por todo auxílio e experiências vividas. Muito Obrigada!

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho viesse a ser consolidado.

Agradeço ao PEEEx, pelo apoio financeiro.

Agradeço à UFOPA, pelo apoio institucional.

RESUMO

O uso do pesticida tem se tornado uma problemática frequente no Brasil e no mundo pelo dano que o mesmo causa ao meio ambiente e a saúde pública. Os pesticidas classificados como organofosforados são considerados altamente tóxicos devido ao seu mecanismo de ação, pois inibem a enzima acetilcolinesterase, ocasionando o acúmulo da acetilcolina nas fendas sinápticas, que gera sintomas da síndrome colinérgica. Dentre os organofosforado, o clorpirifós é um pesticida bastante usado no território nacional como uma alternativa ao combate a pragas na agricultura. Assim, o presente estudo caracterizou as alterações comportamentais do peixe *Colossoma macropomum* (tambaqui) em um Teste de Toxicidade Aguda (96 h) com o pesticida clorpirifós e avaliou as manifestações ocorrentes dos sintomas da síndrome colinérgica derivados do Sistema Nervoso central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP). A metodologia utilizada foi o Teste de Toxicidade Aguda para peixes, formulada pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), o protocolo foi adaptado para o modelo animal usado, o juvenil de tambaqui. Esses animais têm peso médio de $1,02 \pm 0,06$ g e foram distribuídos em grupos de $n=15$, formados por triplicatas de 5 indivíduos por aquário, para cada concentração da faixa de letalidade estabelecida: 2,5; 10; 15; 25 e 45 $\mu\text{g/L}$, e mais um controle (branco). Após análise dos dados foi obtida uma taxa de mortalidade de 16,25% e, a partir das alterações comportamentais observadas foi possível estabelecer um agrupamento, resultando em 10 (eventos ou *score*) de comportamentos manifestados pelos animais durante o período do experimento. Os resultados foram obtidos em 48 horas, quando os animais apresentaram as alterações propostas, evidenciadas por estudos anteriores. Então foi realizada a associação comportamental aos sintomas comportamentais da síndrome colinérgica, sendo possível observar dois tipos de manifestações de alterações neurológicas.

Palavras-Chave: Pesticida. Clorpirifós. Peixe. Síndrome. Colinérgica.

ABSTRACT

The use of pesticides has become a frequent problem in Brazil and in the world due to the damage it causes to the environment and public health. Pesticides classified as organophosphates are considered highly toxic due to their mechanism of action, as they inhibit the enzyme acetylcholinesterase, causing the accumulation of acetylcholine in the synaptic clefts, which generates symptoms of the cholinergic syndrome. Among the organophosphates, chlorpyrifos is a pesticide widely used in the national territory as an alternative to combat pests in agriculture. Thus, the present study characterized the behavioral alterations of the fish *Colossoma macropomum* (tambaqui) in an Acute Toxicity Test (96 h) with the pesticide chlorpyrifos and evaluated the manifestations of the symptoms of the cholinergic syndrome derived from the Central Nervous System (CNS) and Peripheral Nervous System (PNS). The methodology used was the Acute Toxicity Test for fish, formulated by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), the protocol was adapted for the animal model used, juvenile tambaqui. These animals have an average weight of 1.02 ± 0.06 g and were distributed in groups of $n= 15$, formed by triplicates of 5 individuals per aquarium, for each concentration of the established lethality range: 2.5; 10; 15; 25 and 45 $\mu\text{g/L}$, plus a control (blank). After analyzing the data, a mortality rate of 16.25 % was obtained and, from the observed behavioral changes, it was possible to establish a grouping, resulting in 10 (events or score) of behaviors manifested by the animals during the period of the experiment. The results were obtained in 48 hours, when the animals presented the proposed alterations, evidenced by previous studies. Then, the behavioral association with the behavioral symptoms of the cholinergic syndrome was performed, making it possible to observe two types of manifestations of neurological alterations.

Keywords: Pesticide. Chlorpyrifos. Fish. Cholinergic. Syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Fórmula estrutural química geral dos organofosforados. X= O, S ou Se; R1; R2=alquil, aril, SR'ou OR'; L=halogênicos, alquil, aril ou heterocíclicos, incluindo o grupo fosforil (P=O), ou tiofosforil (P=S), e os grupos lipofílicos (arilas ou aquilas) que são R1 e R2, e o grupo L de saída. 14
- Figura 2.** Processos de contaminação aquática por pesticidas lançados no meio ambiente .. 17
- Figura 3.** Exemplar de Juvenil de *Collossoma macropomum* (Cuvier 1818). 21
- Gráfico 1.** Projeção das manifestações comportamentais no tempo inicial das concentrações 15 µg/L, 25 µg/L e 45 µg/L..... 29
- Gráfico 2.** Manifestações comportamentais da exposição ao Clorpirifós® em juvenis de tambaqui em teste de toxicidade (96 horas) nas seis (6) horas após o início dos experimentos nas concentrações de 15 µg/L, 25 µg/L e 45 µg/L.. 30
- Gráfico 3.** Projeção da frequência das manifestações comportamentais nos juvenis de tambaqui em concentrações de 15 µg/L, 25 µg/L e 45 µg/L..... 31
- Gráfico 4.** Comportamentos observados após o marco da primeira morte, nos tempos de 8, 12, 24 e 48 horas em concentrações de 15 µg/L, 25 µg/L e 45 µg/L nos ventos 4, 5, 6, 7, 8, 9. ... 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição comportamental da posição do juvenil de tambaqui em ambiente controlado sem toxicante.....	26
Tabela 2. Descrição dos estágios comportamentais do juvenil de tambaqui frente à exposição ao pesticida clorpirifós® durante o Teste de Toxicidade Aguda (96 horas)	26
Tabela 3. Média dos valores dos parâmetros físico-químicos da água durante o ensaio de Comportamento Ecotoxicológico (Teste de Toxicidade Aguda) com o pesticida clorpirifós® (96h)..	35

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANVISA - Agência de Vigilância Sanitária

AChE – Acetilcolinesterase

ACh – Acetilcolina

AChE – Colinesterase

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

DNT – Neurotoxicidade do desenvolvimento

Escores - Pontuação

GCP1 – Grupo Clorpirifós 1

GCP2 – Grupo Clorpirifós 2

GCP3 – Grupo Clorpirifós 3

GCP4 – Grupo Clorpirifós 4

GCP5 – Grupo Clorpirifós 5

i.e – isto é

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PEEx – Programa de Integração Pesquisa, Educação e Extensão

POPs – Poluentes orgânicos persistentes

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

UFOPA – Universidade Federal do Oeste do Pará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. Pesticida.....	13
2.2. Organofosforado – Clorpirifós	14
2.3. Peixe como modelo animal para estudos Comportamentais de Ecotoxicologia Aquática.	16
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivo Específico	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Animais.....	21
4.2. Aclimação e Manutenção	22
4.3. Teste Toxicidade Aguda para avaliação da sensibilidade tóxica do <i>Colossoma macropomum</i>	22
4.4. Teste Comportamental de Clorpirifós com juvenis de Tambaqui	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são produtos químicos que passaram a ser amplamente utilizados em 1950 com a finalidade de aumentar a produtividade na agricultura. Em 1998 o Brasil se tornou o 3º maior consumidor de agrotóxicos do mundo, e passou a liderar a lista desde 2009, tendo como principais utilizadores desses produtos as lavouras temporárias, como, por exemplo, soja, milho e cana-de-açúcar, ocupando uma área de 63 milhões de hectares de área plantada no ano de 2019 (IBGE/SIDRA, 2019a), seus estudos toxicológicos e ecotoxicológicos passaram a ser exigidos desde 1970 pela sua alta taxa de consumo nacional, a partir dos quais foram constatados os efeitos prejudiciais à saúde humana e ambiental a exposição dessas substâncias.

Estudos de ecotoxicologia são utilizados para a classificação da toxicidade ambiental de pesticida, e esses podem associar o alcance de determinadas substâncias químicas nos ambientes e a extensão de seus efeitos sobre os organismos vivos (NASCIMENTO & MELNYK 2016). Em relação a intoxicação ao ser humano há quatro principais pesticidas: os organoclorados, organofosforados, carbamatos e o paraquato, sendo responsáveis por milhares de mortes todos os anos (SILVA, 2015).

Os organofosforados passaram a ser muito utilizados por se mostrarem extremamente eficazes contra uma ampla variedade de pragas, principalmente os agrícolas. Além disso, constituem pesticidas mais práticos, pois degradam-se rapidamente no meio ambiente, causando um impacto ambiental menos significativo (GUEVARA; PUEYO, 1995), porém, são inseticidas agrícolas altamente tóxicos devido ao seu mecanismo de ação, pois inativam a enzima acetilcolinesterase. Essa enzima é responsável pela hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético nas sinapses colinérgicas e sua inibição ocasiona a hiperestimulação colinérgica nos organismos. Esse efeito pode ocorrer por rotas de sinalização chamadas de nicotínicas, as quais promovem efeitos no músculo esquelético e glândulas autônomas, e por vias muscarínicas, ocasionando efeitos nos músculos lisos e danos no Sistema Nervoso Central (SNC).

O presente estudo focará no pesticida Clorpirifós® que se encontra dentro da categoria de organofosforado. É uma classe de ingestão por contato, ou seja, por via cutânea. Foi listado pela Anvisa como o quinto agrotóxico, entre os próximos ingredientes ativos a serem reavaliados pela Anvisa por apresentar risco a saúde humana. De acordo com discussão internacional o Clorpirifós® apresenta risco de neurotoxicidade para o desenvolvimento (ANVISA 2021a) em estudo realizado em ratos. No entanto, em peixes, os relatos de convulsão

frente ao clorpirifós ou outros organofosforados são apenas citados como sinais de alterações observados, e não existem maiores detalhes (SANTOS 2019).

Os estudos utilizando peixes como modelos experimentais, tem se tornado bastante frequente na área da pesquisa, por certas espécies apresentarem uma taxa de adaptação e sensibilidade bastante significativas às mudanças ambientais. Evidências literárias apontam diferenças significativas na tolerância entre espécies, e até mesmo entre indivíduos coespecíficos, para substâncias isoladas ou múltiplas (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Assim, apesar dos agrotóxicos estarem entre os principais instrumentos do atual modelo de desenvolvimento da agricultura brasileira, devido os efeitos adversos que podem ocasionar sua exposição, há uma crescente preocupação com esses produtos na contaminação das águas superficiais e subterrâneas (MARQUES, 2007). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar possíveis comportamentos que caracterizem manifestações nicotínicas, muscarínicas e danos ao Sistema Nervoso Central, que pudessem possibilitar evidências que o pesticida organofosforado clorpirifós® é um pesticida que pode gerar danos ao peixe *Colossoma macropomum* (tambaqui), uma vez que este organismo é uma espécie de alta demanda no consumo alimentício da população da região amazônica e também de grande importância para a piscicultura nacional, representado mais de 30% da produção pesqueira brasileira (EMBRAPA, 2020).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Pesticida

Os agrotóxicos, também designados como pesticidas, são substâncias químicas utilizadas em amplo espectro para controle/inibição da ação de insetos, fungos, ervas daninhas e outros agentes que possam ser prejudiciais para a agricultura, devido à sua atividade sobre organismos vivos (Baptista, 1999).

De acordo com a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), os agrotóxicos são classificados para os organismos-alvo (i.e. herbicidas, para ervas-daninhas, fungicidas para fungos, inseticidas para insetos, raticidas para ratos, dentre outros). Sua estrutura química é inorgânica (chumbo, cobre, cádmio, mercúrio, entre outros), orgânica de síntese (carbamatos, nitrogenados, clorados, fosforados, clorofosforados) e orgânica vegetal (piretrina, nicotina). Ademais, adota-se a classificação desses compostos pelas faixas toxicológicas letais (extrema, alta, moderada, e pouco tóxica), e por periculosidade ambiental (extrema, alta, moderada, e pouco perigosa) (BRASIL, 2016).

Nas últimas décadas, o uso extensivo de agrotóxicos (para controle de pragas e patógenos) vem sendo relacionado a deterioração do solo, que é uma das consequências mais graves da agricultura tradicional. Antes da Revolução Industrial, as práticas agrícolas eram consideradas mais “amigas” do meio ambiente, pois o rendimento da colheita dependia principalmente de recursos internos, incluindo reciclagem de matéria orgânica e rotação de culturas, para manutenção dos nutrientes do solo e controle biológico de pragas. Esse tipo de agricultura, mantinha o equilíbrio natural entre agricultura e meio ambiente e, portanto, os sintomas de degradação ambiental raramente eram evidenciados (SINGH et al., 2020).

No entanto, no início da década de 1950 os Estados Unidos, trouxe a utilização em massa de agrotóxicos na agricultura, com a chamada ‘Revolução Verde’, que teria o intuito de modernizar a agricultura e aumentar sua produtividade. No Brasil, esse movimento chega na década de 1960 (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018) e o avanço de políticas de crédito agrícola implementadas na década de 70 impulsionaram a utilização e produção de agrotóxicos, alterando o padrão de consumo dessas substâncias ao oferecer subsídios à sua aquisição. Embora a utilização dos agrotóxicos tenha proporcionado o aumento da produtividade agrícola, possibilitando a produção de alimentos a um custo menor, o uso indiscriminado desses produtos pode trazer prejuízos à saúde humana, animal e ao meio ambiente (DOMINGUES et al., 2004).

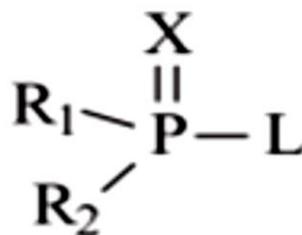
Entre os pesticidas mais utilizados e causadores de intoxicações ocupacionais estão os organofosforados e os carbamatos, pertencentes à classe dos inibidores das enzimas colinesterases (AChE). Esse efeito ocorre devido a fosforilação do sítio ativo dessas enzimas, mecanismo descrito para os organofosforados; no caso dos carbamatos, o que ocorre é a carbamilação, causando a inibição da atividade enzimática (Fukuto, 1990).

Organofosforados e carbamatos estão entre as classes de inseticidas mais utilizadas em todo mundo. Até 1987, juntos respondiam por mais de 71% do que era comercializado (LINHARES, 2013). Esses pesticidas tiveram seu uso intensificado depois da proibição de utilização da maioria dos compostos organoclorados, os quais são menos tóxicos, porém com maior bioacumulação no meio ambiente, entrando por isso na lista dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) (LINHARES, 2013).

2.2. Organofosforado – Clorpirifós®

Os organofosforados são um grupo de compostos químicos derivados do ácido fosfórico. Assim, estes compostos podem ser tióis, amidas ou até mesmo ésteres de ácidos fosfônicos, fosfínicos ou tiofosfóricos (Figura 1). Em relação a sua estrutura química, possuem duas cadeias laterais orgânicas adicionais do grupo cianeto, tiocianato ou fenoxi, conhecidos também como colinérgicos de ação indireta ou anticolinesterásicos (Kumar et al., 2016).

Figura 1 - Fórmula estrutural química geral dos organofosforados. X= O, S ou Se; R1; R2=alquil, aril, SR'ou OR'; L=halogênios, alquil, aril ou heterocíclicos, incluindo o grupo fosforil (P=O), ou tiofosforil (P=S), e os grupos lipofílicos (arilas ou aquilas) que são R1 e R2, e o grupo L de saída.



Fonte: Linhares, 2014.

Os organofosforados são inseticidas agrícolas altamente tóxicos que inativam a enzima acetilcolinesterase (AChE) presente nas sinapses colinérgicas, responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético. Esta inativação irreversível provoca a acumulação de acetilcolina nas sinapses muscarínicas e nicotínicas (SILVA et al, 2016). Desse modo,

devido a ACh ser atuante nos sistemas nervoso central (SNC) e sistemas nervoso periférico (SNP), essa superestimulação provoca uma série de sinais e sintomas que podem caracterizar a intoxicação aguda como “síndrome ou crise colinérgica” (CAVALCANTI et al., 2016). Essa superestimulação desencadeia vários sintomas como: broncorreia, desequilíbrio, depressão respiratória, alterações comportamentais, fasciculação cardíaca e musculoesquelética, convulsões e morte (LINHARES, 2014). Assim, eventuais desordens colinérgicas, decorrentes da ação dos organofosforados, podem afetar as terminações nervosas e sinapses que contém transmissão nervosa pela ACh, bem como nas junções neuromusculares de vertebrados, onde estes atuam como neurotransmissores primários (SILVA, 2015).

A ACh encontra-se distribuída por todo o sistema nervoso, e destacadamente, está presente no cérebro, nas junções neuromusculares, nos gânglios dos sistemas nervosos simpático e parassimpático, além dos pós-gânglios das terminações nervosas parassimpáticas e simpáticas, esta última inerva vasos sanguíneos e glândulas sudoríparas. Ademais, também existem nas terminações nervosas sensoriais e sinápticas não ganglionares supra-renal (COSTA et al., 1988; LINHARES, 2014). Em termos de ação de receptor molecular, a ACh ativa receptores de duas classes: nicotínicos e muscarínicos. Como exemplo, os receptores nicotínicos estão presentes nos gânglios autônomos e musculoesqueléticos; enquanto, os receptores muscarínicos estão presentes na musculatura lisa do miocárdio (regulando frequência dos batimentos cardíacos), da motilidade gástrica, e de glândulas exócrinas, entre outros locais (GUEVARA e PUEYO, 1995; VENTURA et al., 2010).

Já o Clorpirifós® é um composto organofosforado de amplo espectro, com ação inseticida, formicida e acaricida. Assim como outros organofosforados, ele se liga e fosforila a enzima AChE, tanto no SNC quanto no SNP, levando ao acúmulo e ao aumento da estimulação pela acetilcolina, com ocorrência de sinais clínicos de toxicidade (náusea, tontura, confusão e, em altas exposições, paralisia respiratória e morte) (USEPA, 2011).

Nos estudos de toxicidade aguda com o Clorpirifós®, ele apresentou toxicidade alta, moderada e baixa quando administrado pelas vias oral, cutânea e inalatória, respectivamente, sendo classificado como “tóxico por ingestão” e “nocivo em contato com a pele” pela agência europeia (EFSA, 2019). Na Europa, a aprovação do Clorpirifós expirou em janeiro de 2020 e não teve seu registro renovado, conforme disposto no Regulamento de Implementação da Comissão (UE) 2020/18, em razão de preocupação com os aspectos toxicológicos (EC, 2019). No Canadá, a reavaliação do Clorpirifós foi encerrada em maio de 2021, após a etapa de

avaliação de risco ambiental ter sido concluída, resultando no cancelamento de quase todos os usos agrícolas, devido a riscos ambientais preocupantes (PMRA, 2021).

No Brasil, o clorpirifós® é considerado altamente tóxico (classe toxicológica I) para a saúde animal e humana, e seu potencial de risco ambiental é muito perigoso (classe II) (BRASIL, 2016). Atualmente ele ainda é classificado como um produto muito perigoso e tóxico ao meio ambiente (Classificação ambiental II), e sua classificação toxicológica é de nível III (moderadamente tóxico) (AGROFIT 2020)

No ano de 2004, a ANVISA proibiu a disponibilidade de produtos domissanitários à base de clorpirifós®. Não obstante, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) mantém sob recomendações seu uso, em atividades agrícolas, como plantações de soja, algodão, batata, milho, entre outras. Este é um composto organofosforado bastante empregado como alternativa de combate às pragas, nas agriculturas por todo o território nacional (BRASIL, 2016).

Atualmente, no Brasil, o Clorpirifós® foi colocado em reavaliação devido à preocupação em relação aos seguintes aspectos toxicológicos: mutagenicidade e toxicidade para o desenvolvimento, em especial a neurotoxicidade do desenvolvimento (DNT) (ANVISA, 2021a)

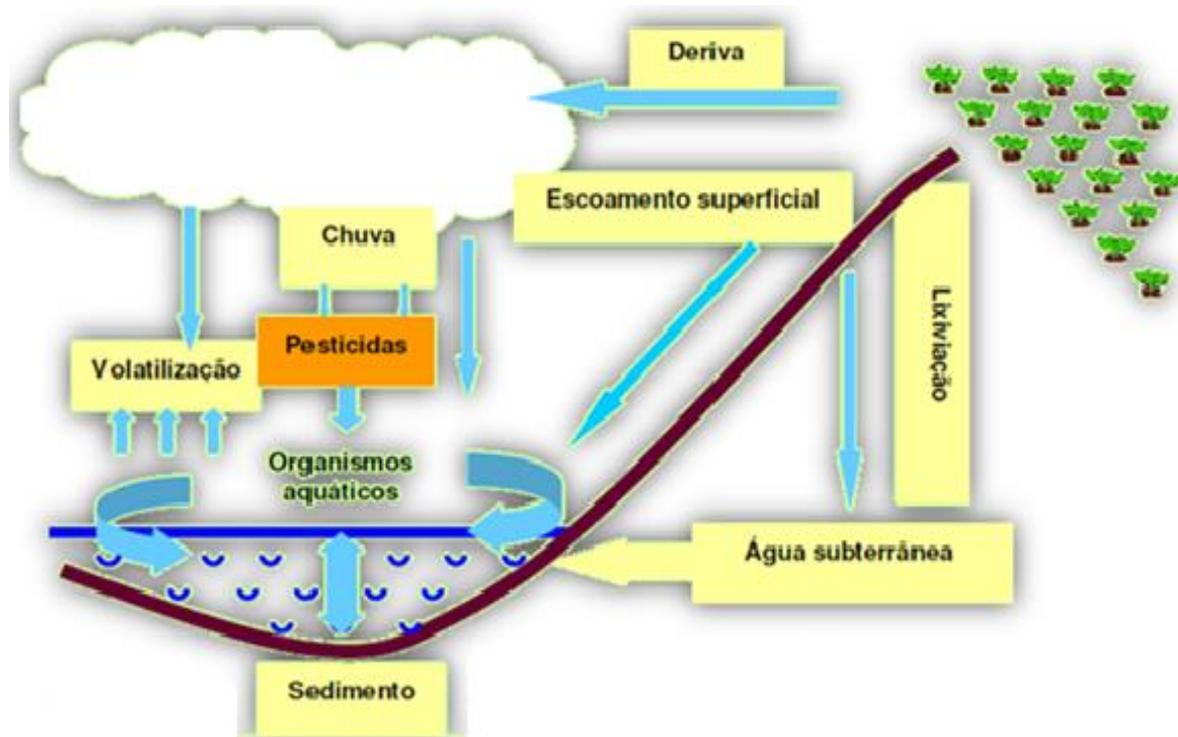
2.3. Peixe como modelo animal para estudos comportamentais de ecotoxicologia aquática

Estudos de ecotoxicologia são utilizados para a classificação da toxicidade ambiental de pesticidas, esses estudos podem associar o alcance de determinadas substâncias químicas nos ambientes e a extensão de seus efeitos sobre os organismos vivos (Nascimento & Melnyk 2016). A Ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (Truhaut (1977); MAGALHÃES & FERRÃO 2008).

Com o uso intensivo de pesticidas em áreas agrícolas, o resultado é a contaminação das águas superficiais e subterrâneas dos corpos hídricos adjacentes, diminuindo assim a sobrevivência dos organismos não alvo que compõem as biotas dos ecossistemas aquáticos (SUNANDA et al., 2016). Mesmo em concentrações baixas, os agrotóxicos representam riscos para algumas

espécies de organismos aquáticos que podem concentrar estes produtos até 1000 vezes, transferindo os efeitos tóxicos para outros organismos da cadeia alimentar (GRIZA et al, 2008). Ao serem lançadas na natureza, esses compostos apolares podem percorrer várias rotas, até alcançar os corpos d'água (Figura 2), e seus resíduos podem vir a alcançar o homem através da ingestão de alimentos e águas contaminadas (LINHARES, 2014).

Figura 2. Processos de contaminação aquática por pesticidas lançados no meio ambiente.



Fonte: ASSIS, 2008

As características físico-químicas dessas moléculas apolares, aliadas às condições ambientais podem influenciar diretamente no carreamento destas através de diversos processos como: lixiviação ou escoamento superficial do solo, e infiltrações para os lençóis freáticos (MARTINEZ e CÓLUS, 2002).

Portanto, a ecotoxicidade das substâncias e os impactos que acontecem nos ambientes aquáticos pode afetar os organismos não alvo e causar intoxicações ecológicas que podem se manifestar nos diferentes níveis organizacionais de maior complexidade (FERREIRA, 2003). Por esse motivo, com base na resolução N° 357 26 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), estes bioensaios são importantes como uma ferramenta para avaliar os riscos das substâncias isoladas ou misturadas, sobre os sistemas aquáticos (SANTOS, 2019).

Uma das vertentes dos estudos em ecotoxicologia considerada importante é a etologia, principalmente pela extrema sensibilidade de percepção fisiológica que esses organismos possuem frente a perturbações no ambiente (HELLOU, 2011). Entre os organismos mais utilizados em pesquisas ecotoxicológicas, destacam-se: peixes, microalgas, microcrustáceos, equinoides, poliquetas, oligoquetas e bactérias, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (OLIVI & ESPÍNDOLA, 2008).

A utilização de peixes em estudos de ecotoxicologia tem se mostrado vantajosa em relação aos testes tradicionais com outros organismos (LEMOS et al. 2005). Em se tratando dos peixes, é notória a importância de alterações sobre o comportamento padrão dos organismos, visto que, são as características específicas (biológicas, químicas e físicas) que conduzem sua adaptação às exposições ecológicas, e direcionam sua sobrevivência no hábitat (AMORIM, 2014). Os peixes demonstram efeitos toxicológicos aos agentes tóxicos em concentrações inferiores as utilizadas em mamíferos, permitindo a avaliação das substâncias que são potencialmente teratogênicas, mutagênicas, aneugênicas e cancerígenas para os seres humanos (LEMOS et al. 2007).

No Brasil, esses estudos de investigações comportamentais em peixes estão presentes nas literaturas, sendo reportados em testes com contaminantes isolados ou efluentes múltiplos em testes ecotoxicológicos dos mais diversos fins (GOUVEIA JR et al., 2006). Esses estudos se iniciaram com *Daphnia magna* (crustáceo) e *Dario rerio* (peixe) na década de 1980 por agências ambientais no mundo todo, principalmente nos EUA e na Europa, os quais foram os primeiros a desenvolver protocolos de testes de toxicidade utilizando organismos aquáticos (SILVA, 2013). No entanto, a utilização de animais na pesquisa tem sido razão de diversas discussões bioéticas focadas no número elevado de animais e no sofrimento causado a eles. O programa dos 3 R – redução (reduction), refinamento (refinement) e substituição (replacement) – objetiva diminuir o número de animais, minimizar sua dor, desconforto e proporcionar alternativas para a substituição dos testes *in vivo* (CAZARIM et al. 2015).

Segundo Rand e Petrocelli (1995) critérios de seleção da espécie vêm sendo adotados para escolha do organismo teste, como: abundância e disponibilidade; significativa representação ecológica dentro das biocenoses; cosmopolitismo da espécie; conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade de suas populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; importância comercial; facilidade de cultivo em laboratório e, se possível, a espécie deve ser nativa para melhor representatividade dos ecossistemas.

Existem várias formas de estudar o comportamento animal frente à toxicantes, e um deles é por intermédio de observações e quantificações (*scores*) de inúmeros parâmetros (*endpoints*) a que se almeja avaliar, onde podem ser incluídas respostas como, medo/fuga, agressividade, memória, capacidades de locomoção, reprodução, alimentação, entre outras nuances (AMORIM 2014). No entanto, os efeitos sobre a natação dos peixes são sempre investigados, porque alterações nas respostas de atividade motoras podem indicar a situação tóxica a que o organismo está submetido (LEVIN et al. 2004).

As evidências literárias informam sobre a toxicidade extrema que o pesticida organofosforado clorpirifós® representa para organismos não alvo aquáticos, e apontam o uso de peixes como uma ferramenta importante para estudos com este composto. A toxicidade deste inseticida expõe os indivíduos à riscos como: alterações morfológicas, comportamentais, oxidativas, bioquímicas, histopatológicas, hematológicas, além de alterações no desenvolvimento, entre outros (SUNANDA et al., 2016).

Com base nas evidências neurotóxicas presentes na literatura, para os organofosforados sobre os peixes, é possível observar que a convulsão é um dos sinais sistêmicos principais associados aos efeitos graves destes agentes químicos (SANTOS 2019). Segundo Linhares (2014) a convulsão é um dos efeitos globais causados pela hiperestimulação colinérgica, gerados pela intoxicação aguda à nível de sistema nervoso central e periférico, que ocasionam crise ou síndrome colinérgica.

De acordo com Bem Hur Mussuline (2013), é importante caracterizar os efeitos de alterações comportamentais vistas em modelos experimentais (assim como os peixes), para a elucidação complementar sobre os efeitos de fármacos ou toxicantes com mecanismos de ação reconhecidos. Porém, o uso de peixes não se limita a estudos comportamentais. Em uma revisão de Bolis e colaboradores (2001) encontram-se diversos usos de peixes como animais experimentais: fisiologia cardíaca e respiratória; cultura celular; ecotoxicologia; endocrinologia; carcinogênese; gerontologia; neurofarmacologia e biologia molecular. A necessidade e relevância dos ensaios utilizando peixes nativos da Região Amazônica como ferramentas de estudo, tem se tornado cada vez mais promissor, uma vez que esses organismos são potenciais bioindicadores de qualidade de água, e também por sofrerem potenciais alterações neurobiológica frente a exposição a contaminantes ambientais (SANTOS 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento de juvenis de *Colossoma macropomum* (tambaqui) expostos ao pesticida Clorpirifós e os comportamentos ocasionados pela síndrome colinérgica.

3.2 Objetivo Específico

- Avaliar alterações comportamentais dos juvenis de tambaqui expostos em um tempo de exposição aguda ao pesticida clorpirifós;
- Caracterizar padrões de alterações temporais no comportamento dos animais expostos ao pesticida clorpirifós;
- Caracterizar alterações decorrentes das diferentes concentrações dos animais ao pesticida clorpirifós associados à síndrome colinérgica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

O projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFOPA (CEUA-UFOPA) com o número 0120210118.

Foram usados 240 espécimes de peixes juvenis da espécie *Colossoma macropomum*, Cuvier 1818 comumente conhecido na região amazônica como Tambaqui (Figura 3), com peso médio de $1,02 \pm 0,06$ g, e comprimento padrão de $2,8 \pm 0,16$ cm, adquiridos de uma piscicultura comercial, abastecida pela Estação de Piscicultura Santa Rosa, Santarém-Pará, Brasil. Na UFOPA (Unidade Tapajós), os espécimes foram acondicionados em caixas d'água de 250L, sob densidade de pelo menos 1g de massa corporal por litro de acordo com o protocolo da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 1992) em ambiente aberto e sombreado, sob fotoperíodo natural claro/escuro de 12/12 horas, durante 20 dias antecedentes aos testes. O modelo animal foi determinado por ser de fácil adaptabilidade e nativa da região amazônica. Segundo a NBR 15088:04 (ABNT, 2004), as espécies elegíveis necessitam possuir alguns pré-requisitos, tais como: (1) tamanho adequado aos experimentos propostos, (2) baixo custo de manutenção, (3) ubiquidade na região, (4) facilidade de reprodução; e (5) tolerância à uma faixa não estreita de espectro de variação de fatores abióticos.

Figura 3. Exemplar de Juvenil de *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818).



Fonte: SANTOS, 2019

4.2. Aclimação e manutenção

Os animais foram aclimatados em caixas d'água de 250L e equipadas com filtro mecânico/biológico de espuma artesanal, suspensos, e acoplados a bombas submersas de recirculação, e compressores de aeração, com saídas de ar conectadas a pedras porosas para garantir oxigenação constante no meio.

Inicialmente, para amenizar o estresse osmótico dos juvenis e fazer profilaxia antiparasitária, logo após a chegada, os peixes foram expostos durante 14h a banho de sal comum não iodado (2g/L), pesado e adicionado diretamente no meio, segundo o método de Tavares-Dias (2015). A água usada na manutenção diária foi de origem subterrânea (poço artesiano), e teve seu pH de 4,2 a 4,5 corrigido com sal de Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃) entre 6,8-7,5, considerando-se níveis toleráveis para a espécie e adequados para os bioensaios. A temperatura da água apresentou variáveis entre 26 e 30 °C, e os níveis de oxigênio dissolvido $\geq 6\text{mg.L}^{-1}$.

Diariamente, os animais foram alimentados no período de manhã e à tarde com ração comercial balanceada (32% de proteína bruta). Por conseguinte, eram feitas sifonagens regularmente para retirada de dejetos e restos alimentares, seguidas de renovação parcial (40%) do volume de água, esse processo permiti equilibrar a acidificação da água, o que garante o controle no acúmulo de amônia nos tanques, além de manter um equilíbrio biológico e simbiótico com os microrganismos presentes no meio e contribuir com bem-estar dos animais. Tal método é necessário, pois, são esses microrganismos os elementos que nitrificam a amônia, transformando-a em formas menos tóxicas, o nitrito e o nitrato. E após aclimatados, os indivíduos saudáveis foram usados nos ensaios comportamentais.

4.3. Teste Toxicidade Aguda para avaliação da sensibilidade toxica do *Colossoma macropomum*

Este estudo foi realizado previamente por SANTOS (2019) no Laboratório de Química Aplicada a Toxicologia, Saneamento Ambiental e Recursos Hídricos da UFOPA (Unidade Tapajós) sendo requerente de trabalho de Dissertação do Programa de Pós-graduação em Biociências (PPG) da UFOPA. Sendo adotadas e adaptadas as orientações do Guia N° 203 para Testes de Toxicidade Aguda em Peixes da OCDE (1992) e da norma da ABNT 15088:04 (2004). Este estudo está inserido no projeto “Determinação para peixes amazônicos da ecotoxicidade e risco de pesticidas utilizados em lavouras de soja”.

A sensibilidade dos juvenis de tambaqui foi testada previamente com a substância de referência dicromato de potássio, para posterior aplicação dos testes de toxicidade aguda com o pesticida clorpirifós®. Em ambos os casos foram estimadas as concentrações médias letais para 50% (CL50) dos indivíduos amostrais. O teste foi realizado em um circuito com dezesseis (16) aquários de vidro transparente, de capacidade para 17L, sendo utilizados apenas 16L por unidade. Foram monitorados os parâmetros [pH, oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C), condutividade elétrica ($\mu\text{s}/\text{cm}$), dureza total (mg de CaCO_3/L), amônia total (mg/L), e alcalinidade (mg de CaCO_3/L)] em cada unidade no decorrer do teste, nos intervalos de: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de teste. Todos os experimentos ocorreram em 96 horas, sob sistema estático, sem renovação de água e sifonagem. E os animais tiveram alimentação suspensa 24 horas antes do início dos testes. Os peixes tiveram mortalidade inspecionada nos respectivos intervalos de: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de teste (SANTOS, 2019).

Nos testes com Dicromato de potássio foram feitos três ensaios preliminares, com uma replicata (n=5) para cada concentração mais o branco, sendo estimada a faixa de letalidade entre 50 mg/L e 215 mg/L da substância de referência dicromato de potássio, utilizando-se 90 indivíduos nesta etapa. No teste definitivo, os indivíduos foram distribuídos em triplicatas (n=15) por concentração e um branco sem o tóxico, perfazendo 80 indivíduos. A concentração média letal (50%) em 96 horas foi estabelecida no intervalo entre a menor contração letal e a maior concentração não letal (SANTOS, 2019). Os grupos receberam as seguintes concentrações nominais do dicromato de potássio (DP): Branco (B): 0 mg/L; Grupo Dicromato de Potássio 1 (GDP1): 50 mg/L; Grupo Dicromato de Potássio 2 (GDP2): 100 mg/L; Grupo Dicromato de Potássio 3 (GDP3): 125 mg/L; Grupo Dicromato de Potássio 4 (GDP4): 150 mg/L; Grupo Dicromato de Potássio 5 (GDP5): 215 mg/L (SANTOS, 2019).

Nos testes de sensibilidade aguda realizados com Clorpirifós foram feitos três ensaios preliminares com uma replicata (n=5) para cada concentração mais o branco, sendo estimada a faixa de letalidade entre 2,5 e 45 $\mu\text{g}/\text{L}$ do clorpirifós®, utilizando-se 150 indivíduos nesta etapa. A concentração média letal (50%) em 96 horas foi estabelecida no intervalo entre a menor contração letal e a maior concentração não letal. No teste definitivo, os indivíduos foram distribuídos em triplicatas (n=15) por concentração e um branco sem o tóxico, perfazendo 80 indivíduos. Os grupos receberam as seguintes concentrações nominais do clorpirifós® (CPF): Branco (GC): 0 $\mu\text{g}/\text{L}$; Grupo Clorpirifós 1 (GCP1): 2,5 $\mu\text{g}/\text{L}$; Grupo Clorpirifós 2 (GCP2): 10

43 µg/L; Grupo Clorpirifós 3 (GCP3): 15 µg/L; Grupo Clorpirifós 4 (GCP4): 25µg/L; Grupo Clorpirifós 5 (GCP5): 45 µg/L (SANTOS, 2019).

Foram então obtidos os seguintes resultados a partir do teste de sensibilidade com Dicromato de potássio, a CL_{50-96h} foi de 109, 26 mg/L (Figura 1) e o Clorpirifós a CL_{50-96h} ocorreu em 16,42 µg/L para juvenis de tambaqui. Os dados foram aceitos quando não houve mortalidades ocorridas em 10 % de mortes no branco (aquário controle).

4.4. Teste comportamental de Clorpirifós com juvenis de tambaqui

Para este estudo foram utilizadas as orientações do Guia N° 203 para Testes de Toxicidade Aguda em Peixes da OCDE (1992) e da norma da ABNT 15088:04 (2004), esses protocolos foram adaptados para o modelo animal (tambaqui) usados durante os experimentos, sob aprovação de nº 06004/2016. pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOPA.

O teste foi realizado utilizando um circuito com dezesseis (16) aquários de vidro transparente de capacidade para 17L, sendo usado apenas 16L por aquário. Os experimentos ocorreram todos em 96 horas, em um sistema estático, sem renovação de água e sifonagem, as 24 horas que antecederam os experimentos os animais tiveram sua alimentação suspensa. Os parâmetros monitorados foram o pH, oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C), condutividade elétrica (µs/cm), dureza total (mg de CaCO₃/L), amônia total (mg/L), e alcalinidade (mg de CaCO₃/L) em cada unidade no decorrer do teste, nos intervalos de: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de teste. Foram feitos três ensaios preliminares com uma replicata com cinco indivíduos (n=5) para cada concentração mais o branco (controle), sendo utilizada as mesmas concentrações propostas por Santos (2019).

Nos testes definitivos os indivíduos foram distribuídos em triplicatas (n=15) por concentração e um controle (branco) sem o tóxico, totalizando 240 indivíduos (n= 240), em três (3) rodadas de testes. As concentrações nominais utilizadas foram as seguintes: Branco Controle (BCC): 0 µg/L; Grupo Clorpirifós 1 (GCP1): 2,5 µg/L; Grupo Clorpirifós 2 (GCP2): 10 43 µg/L; Grupo Clorpirifós 3 (GCP3): 15 µg/L; Grupo Clorpirifós 4 (GCP4): 25µg/L; Grupo Clorpirifós 5 (GCP5): 45 µg/L.

Durante os testes preliminares foram observados os comportamentos analisados no etograma elaborado de Santos (2019) (figura), ou seja, as descrições de comportamentos observados nos juvenis de tambaqui expostos em aquário ausentes de tóxico (ambiente controlado), tais análises foram posteriormente utilizadas para comparação de sinais

comportamentais da intoxicação com o Clorpirifós. Os efeitos indicando possíveis alterações no comportamento dos juvenis expostos ao Clorpirifós foram anotados e feitos registros com vídeos de 2 minutos. São estes: aumento ou diminuição da respiração opercular, perda de equilíbrio, excitabilidade, aumento ou diminuição de excretas, mudança de coloração, liberação de muco, convulsão, espasmos, letargia, natação errática, entre outros.

Os aspectos de análises comportamentais do animal modelo decorreram no modo de pesquisa descritiva/exploratória, incluindo abordagem qualitativa e quantitativa. O método descritivo viabiliza descrever as características de uma determinada população ou amostra permitindo a coleta de dados através do uso de recursos e técnicas padronizadas, bem como instrumentos pré-elaborados (tabelas, questionários, entre outros), tomando forma de levantamento no geral, enquanto, que, a metodologia exploratória busca explicitar ou gerar hipóteses, a partir de pesquisas literárias, e ainda estudos de caso (GIL, 2009).

A coleta de dados experimentais está embasada em tabelas elaboradas com variáveis comportamentais que foram observadas durante no período preliminar de testes, tais como: comportamentos padrões da espécie em aquários com a ausência de tóxicos e alterações comportamentais com a presença de tóxicos. Além das observações prévias com as variáveis especificadas foram usados animais controles (branco) para comparações durante os períodos de ensaios.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram observados os estados de comportamento padrão do juvenil de tambaqui de acordo com sua posição no aquário em um ambiente sem toxicante, para posterior comparação (Tabela 1). Os dados estabelecidos foram analisados, considerando a frequências comportamentais exercida pelos indivíduos, ou seja, o número de repetições compartilhado pela maioria dos indivíduos do grupo.

Tabela 1 - Descrição comportamental da posição do juvenil de tambaqui em ambiente controlado sem toxicante.

Zona Inferior (ZIF): No contato inicial com o ambiente, os juvenis, exploram esta zona demonstrando excitação de nado, e por conseguinte, costumam permanecer aglomerados com nado estacionário, em situações, de repouso, e de forrageio. Normalmente, quando estes sofrem perturbações aparentam aumento de motilidade, e de maneira precipitada, migram para as outras zonas.

Zona Intermediária (ZIT): Nesta zona da coluna d'água os animais costumam transitar ou permanecer em situações de nado em repouso (estacionário), e geralmente, não apresentam aglomerações. Depois da zona inferior, este é o ponto mais frequentado pelos animais em estado estacionário. Além disso, é normalmente nesta região da coluna d'água que ocorrem a maioria das interações agonistas observadas (perseguição, luta, fuga).

Zona Superior (ZSP): No primeiro contato com o ambiente, esta zona é bastante explorada, mas, subsequentemente, torna-se, a menos frequentada na coluna d'água. Por outro lado, em situações de estresse respiratório, estes animais costumam migrar preferencialmente para esta zona, e podem permanecer por períodos prolongados.

Fonte: SANTOS 2019

Durante os ensaios experimentais com o pesticida, foram observadas e anotadas as alterações comportamentais de cada concentração e de todas as 17 unidades experimentais, o controle foi utilizado como modelo comparativo do toxicante. A tabela 2 compõe as descrições comportamentais e os estágios observados nos animais expostos.

Tabela 2 - Descrição dos estágios comportamentais do juvenil de tambaqui frente à exposição ao pesticida clorpirifós® durante o Teste de Toxicidade Aguda (96 horas).

-
0. Animal sem efeitos tóxicos, apresentando comportamentos normais ao seu padrão comportamental basal.

 1. À priori, o animal pode apresentar, alteração na respiração oro-branquial (acelerada, com movimentos operculares acelerados), e ainda, ocorrer aumento de sua motilidade para as zonas intermediária e superior, aparentando nado contínuo com movimentos rápidos e abruptos do corpo e das nadadeiras;

 2. O animal passa a apresentar nado estacionário com oscilação (agitação - “sacudidelas”) caudal e déficit de motilidade na coluna d'água, migrando temporariamente para a zona superior, permanecendo nesta zona por mais tempo. A partir desta etapa pode ser observada alteração na coloração da superfície corporal, com a presença de escurecimento;

 3. O animal pode apresentar perda de equilíbrio e respiração oro-branquial acelerada e, pode ser observada a protrusão labial. Além disso, podem ser percebidos giros e rodopios na superfície e/ou episódios oscilatórios (saltos) de alta excitabilidade, caracterizando-se como respostas de estresse respiratório. Existem casos de convulsão a partir desta fase;

 4. O animal pode apresentar nado errático persistente e respiração oro-branquial levemente acelerada. Pode ocorrer a perda súbita do padrão natatório, caracterizado pelos desacertos deste no seu deslocamento pela coluna d'água, com movimentos desorientados de nado. A partir desta fase pode haver ou não evidência de rubor por todo corpo, com mais intensidade na região opercular e abaixo da nadadeira dorsal, caracterizando-se como resposta inflamatória e/ou hemorragia muscular;

5. O animal, pode demonstrar perda de equilíbrio e episódios curtos de paralisia (da musculatura axial), com poucos movimentos de suas nadadeiras pélvicas, peitorais mais respiração oro-branquial lenta, além de, períodos espasmódicos ou convulsões esporádicas (semelhante à fase clônica de uma crise convulsiva) com contorções corporais e deslocamentos pequenos de curta duração;
6. O animal, apresenta rigidez do músculo – esquelético axial, podendo resultar em uma anormalidade corporal. Com isso, este demonstra respiração oro-branquial oscilante (*i.e.* ao reduzir seus movimentos natatórios os batimentos oro-branquiais ficam acelerados, e não obstante, seus batimentos respiratórios ficam imperceptíveis); reduzidos movimentos de suas nadadeiras pélvicas e peitorais;
7. É possível observar episódios prolongados de letargia e/ou paralisia do animal, onde, este fica em estado inerte e paira na coluna d'água, ficando condicionado a ser deslocado pelo fluxo do ambiente (aeração artificial), e por vezes, nota-se, o tombamento no fundo do aquário e manter-se nesta posição por períodos curtos ou prolongados, demonstrando batimento opercular muito acelerado;
8. O animal pode evidenciar estágios letárgicos persistentes (paralisia corporal e manutenção dos movimentos operculares com uma frequência reduzida, e eventuais movimentos das nadadeiras peitorais) e aparenta alta hipersensibilidade à estímulos externos, pois, quando sofre perturbações alheias nada rapidamente em círculos;
9. O animal pode apresentar uma crise convulsiva mais prolongada, onde, este aparenta paralisia seguido de contorções no corpo (semelhante à fase tônica da de uma crise convulsiva), podendo apresentar rodopios irregulares com nado rápido em círculos, e ainda pode ocorrer, simultaneamente, episódios espasmódicos e/ou tremores intensos, seguido de um deslocamento veloz, em um percurso sem orientação de nado (semelhante à fase clônica de uma crise convulsiva). Além disso, essas alterações podem vir seguidas, posteriormente, por uma letargia, onde as nadadeiras peitorais e o opérculo ficam estendidos involuntariamente para a posição mais anterior possível;
10. O animal cessa os movimentos das nadadeiras peitorais mais os vestígios de respiração oro-branquial, e sua homeostase é encerrada, provocando sua morte.

Fonte: SANTOS, 2019

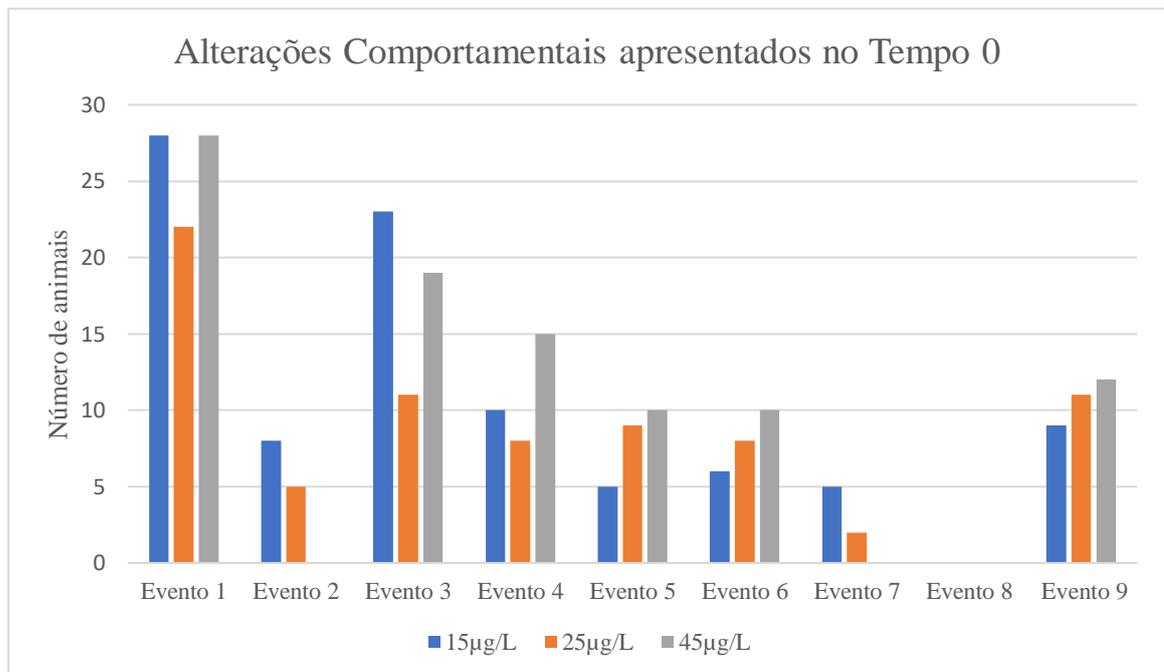
Os parâmetros comportamentais observados permitiram estabelecer a relação entre concentração-resposta através de critérios como ocorrências de quantitativo de animais nas horas em que foram verificados. Com os dados adquiridos foram analisadas principalmente as concentrações de 15 µg/L, 25 µg/L e 45 µg/L no intervalo de 48 horas (Gráfico 1). De acordo com Eaton et al., (2008), na intoxicação aguda, o clorpirifós® possui ação toxicológica aguda de 48 horas, após a exposição inicial do organismo, podendo o indivíduo sofrer a ação tóxica, se desintoxicar (detoxificação), ou o composto volatilizar por este período e assim atenuar seus efeitos no ambiente.

Levando em consideração que neste intervalo de tempo foi possível observar a mortalidade na população de juvenis, se objetiva que a substância volatilizou no intervalo de 48 horas, razão pela qual os animais passaram a apresentando sintomas de estresse e colinérgicos com dois tipos de manifestações da síndrome colinérgica: a primeira, envolvendo o sistema nervoso autônomo, com sintomas Nicotínicos, caracterizados por estimulação excessiva da musculatura esquelética, e a última manifestação sendo a nível de SNC.

De acordo com Marques e Caixeta (2016), os agrotóxicos organofosforados possuem, como principal mecanismo de ação a inibição da enzima acetilcolinesterase, fazendo com que

acetilcolina não sofra lise e conseqüentemente acumule na fenda sináptica, ocasionando a síndrome colinérgica, sendo também um mecanismo de ação ocorrente no clorpirifós. As concentrações de 2,5µg/L e 10µg/L estavam abaixo da CL50 e não apresentaram alterações comportamentais significativas ao objetivo do estudo.

Gráfico 1. Projeção das manifestações comportamentais no tempo zero.



Nas primeiras seis (6) horas não ocorreram mortes, período no qual foram observadas alterações comportamentais, os quais começaram a ser registrados logo após os primeiros 15 minutos da exposição ao toxicante aos animais, com, por exemplo: leves mudanças em seu comportamento padrão, principalmente relacionadas a mudanças de zona de natação (intermédio e superior) e respiração oro-branquial.

Os estudos relatam semelhanças de comportamentos apresentados em testes de toxicidade com peixes, como a pesquisa realizada por Adeyemo et al., (2004), onde os autores relataram os distúrbios em juvenis de *Clarias gariepinus* (bagre-africano), como: batimento opercular acelerado, movimentos irregulares e erráticos, nado contínuo, perda de equilíbrio, respiração na superfície, além de produção excessiva de muco, hemorragia aparente na região opercular, e convulsão tônica antes da morte.

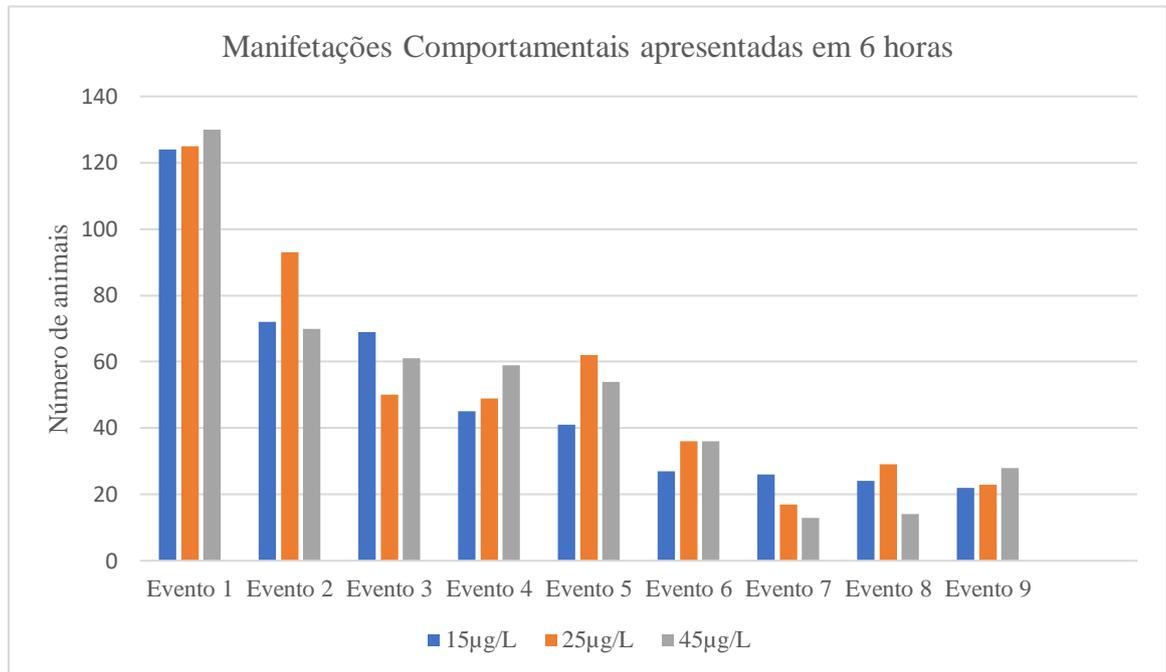
De acordo com Halappa e David (2009), o clorpirifós® (20% EC) causou alterações comportamentais como: nado errático, hiper excitabilidade, perda de equilíbrio total, afundamento, e alteração morfológica na flexão caudal, em juvenis de *Cyprinus carpio* (carpa-

comum). Moura (2009), reportou alterações sobre o comportamento de juvenis de tambaqui como: natação errática, nado e respiração na superfície, mudança na coloração, letargia, e formação de muco, em exposição ao herbicida glifosato. Santos (2019) relatou que apesar do tambaqui ser uma espécie de peixe amazônica muito estudada, ainda possui poucos relatos literários acerca de seus comportamentos na natureza.

Logo após o início do experimento, os animais passaram a apresentar sintomas de estresse caracterizados por: evento um (1) – alteração na respiração oro-branquial, aumento de sua motilidade para as zonas intermediária e superior, aparentando nado contínuo com movimentos rápidos e abruptos do corpo e das nadadeiras; evento dois (2) – nado estacionário com agitação caudal e déficit de motilidade na coluna d'água, migrando temporariamente para a zona superior e permanecendo nesta zona por mais tempo, os animais apresentaram também mudanças de coloração na superfície corporal (escurecimento); evento três (3) – perda de equilíbrio e respiração oro-branquial acelerada e, pode ser observada a protrusão labial. Também se observou giros e rodopios na superfície e/ou episódios oscilatórios de alta excitabilidade, caracterizando-se como respostas de estresse respiratório e existem casos de convulsão a partir desta fase. As manifestações da síndrome colinérgica, passam a ser observados nos eventos posteriores as manifestações de estresse, sendo, portanto, essas manifestações incluídas nos eventos quatro (4), cinco (5), seis (6), sete (7), oito (8) e nove (9). De acordo com no evento oito (8) nenhum animal apresentou as alterações previstas neste evento, uma razão justificada para esta situação, seria, o tempo insuficiente para apresentar tais comportamentos.

Ao longo das 6 horas após o início dos ensaios ocorreram alterações que podem ser associados aos sintomas de ação nicotínicas, ou seja, hiperestimulação do músculo esquelético e glândulas autônomas, apresentando fraqueza muscular, fasciculações (espasmos) e tremores, além de alterações no SNC apresentando paralisia e convulsões que ocorrem principalmente devido a hiperestimulação ocasionada pela dessensibilização de receptores colinérgicos ocasionando espasmos, aceleração da frequência cardíaca, observada na aceleração do batimento opercular, paralisia e outros comportamentos caracterizados nos eventos 4, 5 e 6, os animais também apresentaram em menor frequência comportamentos ocasionados por alterações ao SNC, como letargia ou paralisia do animal, batimento opercular acelerado, hipersensibilidade a estímulos externos e convulsões, observados nos eventos 7, 8 e 9 (Gráfico 2).

Gráfico 2. Manifestações comportamentais da exposição ao Clorpirifós® em juvenis de tambaqui em teste de toxicidade (96 horas) nas seis (6) horas após o início dos experimentos nas concentrações de 15 µg/L, 25 µg/L e 45 µg/L.

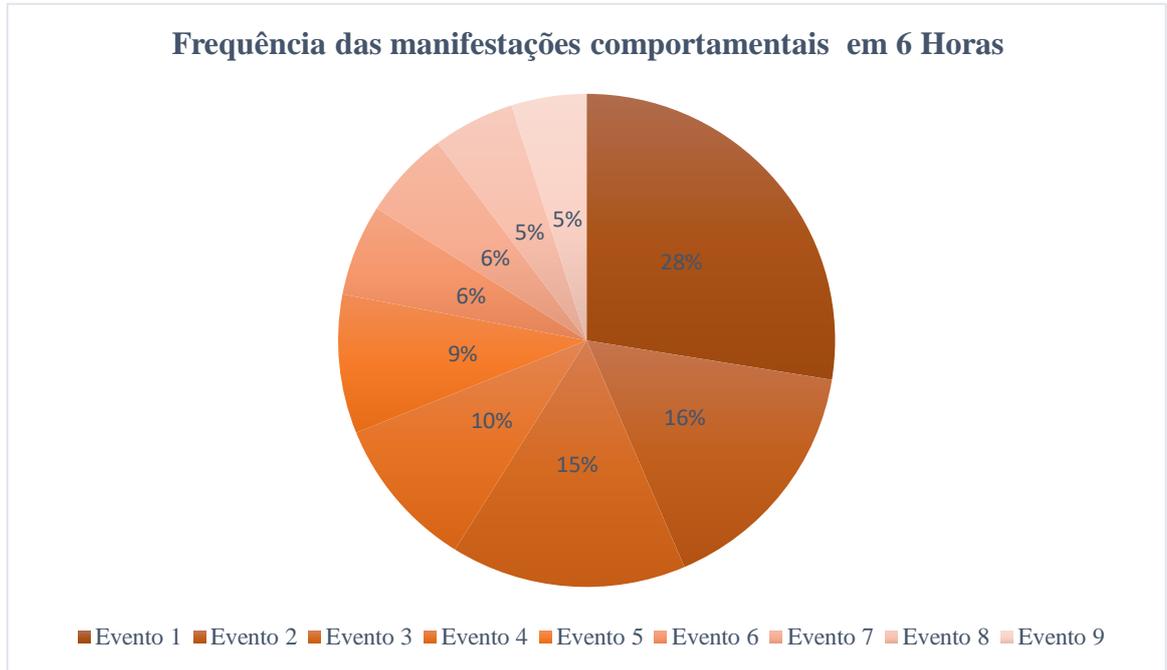


Fonte: Autoral, 2023

A concentração de 45µg/L apresentou efeitos como: batimento opercular acelerado, perda de equilíbrio natatório, rigidez muscular e convulsão tônica, principalmente observado no evento 9, sendo que apenas 5% da população apresentou esses comportamentos. As demais concentrações, incluindo a de 2,5µg/L e 10µg/L (em menor frequência), manifestaram alterações que não foram percebidas na concentração de 45µg/L, como: nado na zona superior, respiração na superfície, nado errático, rigidez muscular, paralisia, espasmos e convulsão clônica, sendo comportamentos caracterizados nos eventos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, porém apenas os eventos 4, 5, 6, 7, 8 possuem relevância para esse estudo, pois, apresentaram as manifestações da síndrome colinérgica.

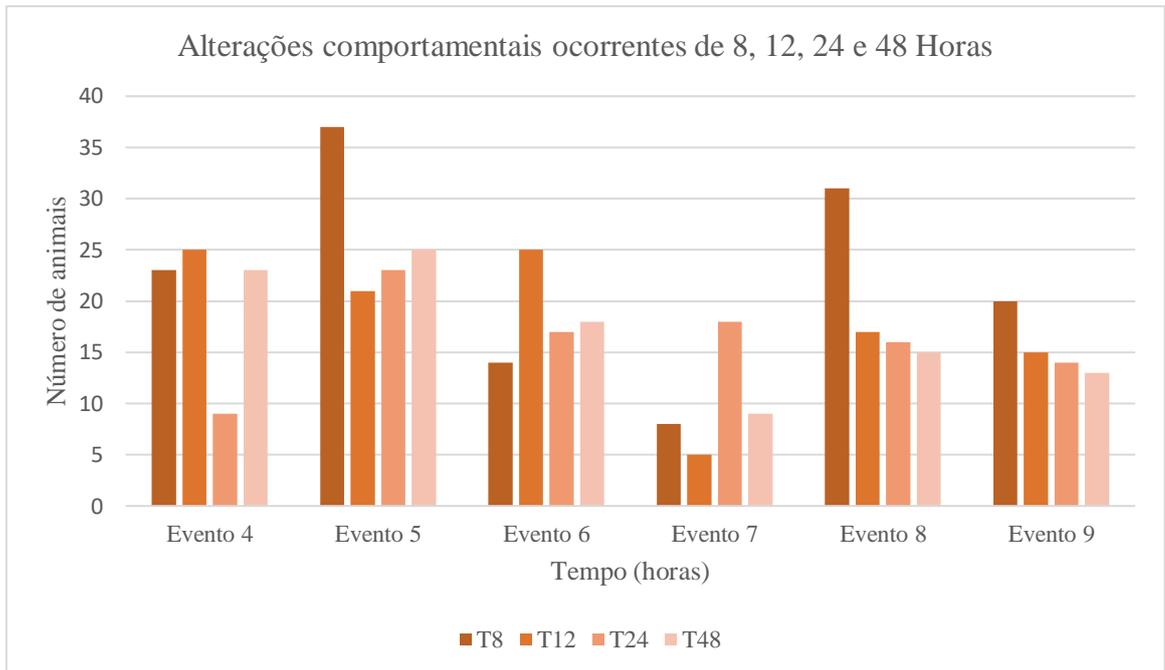
Antes da ocorrência da primeira morte, ou seja, nas primeiras seis horas, 10% da população apresentou comportamentos como nado errático, leve aceleração do batimento orobrânquial e perda súbita do padrão natatório (evento 4); 9% dos animais demonstraram perda de equilíbrio, curtos episódios de paralisia e convulsões esporádicas, signos nicotínicos(evento 5); 6% apresentou rigidez muscular (evento 6), 6% apresentou episódios de paralisia prolongada com batimento opercular acelerado (evento 7) e 5% dos animais apresentaram paralisia persistente e hipersensibilidade a estímulos externos (evento 8) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Projeção da frequência das manifestações comportamentais nos juvenis de tambaqui em concentrações de 15 µg/L, 25 µg/L e 45 µg/L.



Depois da primeira morte, a população experimental teve a mortalidade em 16,25% no intervalo de 6 a 48 horas. O evento 5 apresentou o maior pico de manifestações comportamentais no intervalo de 8, 24 e 48 horas, no qual os indivíduos apresentaram com maior frequência curtos episódios de paralisia, convulsões esporádicas e perda de equilíbrio que são comportamentos associados a alterações neurológicas, ou seja, dano ao SNC e SNP. E o evento 6 apresentou o maior pico em 12 horas, no qual os animais manifestaram rigidez no músculo, respiração opercular oscilante e redução de movimentos das nadadeiras peitorais e pélvicas. O evento 9 que caracteriza os comportamentos mais prolongados de danos no sistema nervoso central apesar de não ocorrer em uma frequência maior é o mais preocupante, pois podem progredir para danos permanentes (Gráfico 4).

Gráfico 4. Comportamentos observados após o marco da primeira morte, nos tempos de 8, 12, 24 e 48 horas em concentrações de 15 µg/L, 25 µg/L e 45 µg/L nos ventos 4, 5, 6, 7, 8, 9.



Fonte: Autoral, 2023

Neste estudo os bioensaios de toxicidade aguda e evidências da literatura foram importantes métodos para análises de alterações comportamentais do *C. macropomum*, causadas pelo Clorpirifós®, onde foi possível evidenciar as manifestações da síndrome colinérgica utilizando esse modelo experimental. É importante ressaltar que esses efeitos podem ser irreversíveis, como mencionado no estudo realizado por Vásquez e Raposo (2021), no qual foi demonstrado que exposição em baixas doses de organofosforado pode produzir alterações no neurodesenvolvimento de crianças.

Para determinar se os padrões de qualidade da água se mostraram adequadas para aplicação dos testes, foram realizadas medições de alguns parâmetros físico-químicos da água de diluição dos testes em todas as etapas (tabela 3). O monitoramento das características físico-químicas do meio de diluição em testes de toxicidade se faz necessário, pois ameniza interpretações equivocadas pelas respostas dos organismos (BERTOLETTI, 2009).

Tabela 3. Média dos valores dos parâmetros físico-químicos da água durante o ensaio de Comportamento Ecotoxicológico (Teste de Toxicidade Aguda) com o pesticida clorpirifós® no tempo de (96h)

Parâmetros	Clorpirifós®
	Média ± Desvio Padrão
Temperatura (°C)	24,6 ± 0,47
pH	7,6 ± 0,01
Condutividade Elétrica (µs/cm)	467,63 ± 2,27
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6,60 ± 0,05
Dureza Total (mg de CaCO ₃ /L)	15 ± 3,36
Alcalinidade Total (mg de CaCO ₃ /L)	18 ± 3,84
Amônia Total (mg/L)	0,09 ± 0,06

Fonte: Autoral, 2023

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O pesticida organofosforado clorpirifós® causou toxicidade severa para juvenis de tambaqui, alterando padrões comportamentais, a partir dos quais foi possível associar a síndrome colinérgica. As alterações descritas sugerem os efeitos nocivos do clorpirifós® ao meio ambiente e aos organismos aquáticos, os quais podem reter essa substância por meio da bioacumulação, bioconcentração e magnificação, provocando assim efeitos de alterações comportamentais, neurológicos e reprodutivos nesses organismos, representando uma ameaça para a sobrevivência de animais e da população que possa vir a ingerir peixes contaminados. Além disso, destacamos que este estudo serviu como validação do uso de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) como modelo para testes comportamentais de exposição aguda a produtos químicos.

Dessa forma, o presente estudo aponta para a importância de maiores investigações ecotoxicológicas para pesticidas sobre ictiofaunas da Amazônia, já que a região está sendo bastante explorada por ser uma nova fronteira agrícola, isso também gera danos mais prolongados, pois não há um controle da compra e venda desses agrotóxicos, então, não se sabe os danos que podem vir a acarretar ao meio ambiente e a saúde humana a longo prazo.

REFERÊNCIAS

- ADAPAR. **Consulta de bula Clorpirifós:** Lorsban 480. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/lorsban480br260218.pdf>. Acesso em: 08. agosto. 2022.
- ADEYEMO *et al.* Acute toxicity of chlorpyrifos (Dursban®) to *Clarias gariepinus* juveniles. **Trop. Vet.**, v. 22, n .1, p. 7-11, 2004.
- AGROFIT. **Consulta de ingrediente ativo:** Clorpirifós. 2020. Disponível em: Acesso em: 08. agosto. 2022.
- AMORIM, João Antônio Silva. **Avaliação do espectro de reação de um sistema de diagnóstico por vídeo rastreio de Peixes Zebra (Danio rerio) expostos a cinco tóxicos distintos.** 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e Toxicologia e Contaminação Ambientais, Universidade do Porto, Portugal, 2014.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Reavaliação de agrotóxicos: Quais os próximos agrotóxicos que serão reavaliados pela Anvisa? Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoinformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/reavaliacao-de-agrotoxicos-2/reavaliacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 17 de fev. 2021a.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos: Monografias autorizadas de agrotóxicos. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoinformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/reavaliacao-de-agrotoxicos-2/reavaliacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 17 de fev. 2021b.
- BAPTISTA, G. C. de. Desenvolvimento do uso de pesticidas / inseticidas. Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos. GARP- Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. São Paulo, Brasil, p.6-11, 1999.
- BARTHEM, R. B.; FABRÉ, N. N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia, 2002, 268 p. In: (Ed.). **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira.** Ibama/Pro várzea, Manaus, Brasil, p. 17-62, 2002.
- BEAUVAIS S. L., Cole K. J., ATCHISON G. J., COFFEN M. Factors affecting brain cholinesterase activity in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Water Air Soil Pollut** 135: 249 – 264
- BERTOLETTI, E. **Sensibilidade de algumas espécies de peixes de água doce utilizadas no Brasil.** J. Braz. Soc. Ecotoxicol. v. 4, n. 1-3, p. 9-13, 2009.
- BOLIS, C. L. *et al.* Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacological research**, v. 44, n. 4, p. 265-280, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde.** – Brasília: Ministério da Saúde, v. 2, 2016.

BUIKEMA JR, Arthur L.; VOSHELL JR, J. Reese. Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. 1993.

CAVALCANTI *et al.* Intoxicação por Organofosforados: Tratamento e Metodologias Analíticas Empregadas na Avaliação da Reativação e Inibição da Acetilcolinesterase, **Rev. Virtual Quim.** v. 8, n. 3, p. 739-766, 2016.

CAZARIN K.C.C, CORRÊA C.L, ZAMBRONE F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** – RBCF;40(3):289-99, 2004.

COSTA, R. *et al.* Intoxicações Agudas Por Compostos Organofosforados. **Acta Médica Portuguesa**, v.1, n. 4-6, p. 291-295, 1988.

EATON, David L. *et al.* Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical reviews in toxicology**, v. 38, n. sup2, p. 1-125, 2008.

EC. European Commission. Chlorpyrifos SANTE/11938/2019 Rev 1. **Final Renewal report for the active substance chlorpyrifos**. Acesso em: 6 December 2019.

EFSA. European Food Safety Authority. **Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos**. European Food Safety Authority Journal. 2019.

FERREIRA C. M. **Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental**. *Biológico*, v.65, n.1-2, p.17-18, 2003.

FUKUTO R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environ Health Perspect**; 87: 245 – 254; 1990.

GOUVEIA J.R, Amauri; MAXIMINO, C.; BRITO, T. M. **Comportamento de peixes: Vantagens e utilidades nas neurociências**. Faculdade de Ciências/UNESP. Bauru: SP, p. 80, 2006.

GUEVARA, J.L. de. PUEYO, V.M. **Toxicología médica: clínica y laboral**, Madrid: Interamericana, McGraw-Hill, 1995.

HALAPPA, R.; DAVID, M. Behavioural responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) following sub-lethal exposure to chlorpyrifos. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.9, p. 233-238, 2009.

HELLOU, J. **Behavioural ecotoxicology, an "early warning" signal to assess environmental quality**. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 18, p. 1-11, 2011.

IBGE/SIDRA - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/Sistema IBGE de Recuperação Automática. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2019a.

JOHN, E. M.; SHAIKE, J. M. Chlorpyrifos: pollution and remediation. **Environmental Chemistry Letters**, v. 13, n. 3, p. 269-291, 2015.

JÚNIOR, José F.; ALVES, M. Eugénia; SOUSA, A. Intoxicação por organofosforados. **Medicina Interna**, v. 6, n. 2, p. 89, 1999.

KUMAR, S., KAUSHIK, G., VILLARREAL-CHIU, J. F. Scenario of organophosphate pollution and toxicity in India: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, 23(10), 9480-9491, 2016.

LEMOS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANIA, M.S. Evaluation of environmental water using the comet assay in tilapia *rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 197 – 201, 2005.

LEMOS, C.T.; RODEL, P.M.; TERRA, N.R.; OLIVEIRA, N.C.D.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 391 – 401, 2007.

LEVIN et al. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behaviour. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, p 719-723. 2004.

LINHARES, Amanda Guedes. **Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como biomarcador da exposição ocupacional**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

MAGALHÃES, Danielly de Paiva; FERRÃO FILHO, Aloysio da Silva. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.**, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MARQUES, Paula Vieira; CAIXETA, Bruno Tolentino. A Importância da Avaliação das Dosagens das Colinesterases em Casos de Intoxicações Por Organofosforados. **Psicologia e Saúde em debate**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2016.

MARQUES, Maria Nogueira *et al.* Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape, São Paulo. **Química Nova**, v. 30, p. 1171-1178, 2007.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. **A bacia do Rio Tibagi. Editora dos Editores, Londrina, PR, Brazil**, p. 551-577, 2002.

MOURA, Emerson Eduardo Silva de. **Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes**. 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Bioecologia Aquática, Centro de Biociências, Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

NASCIMENTO, Luciano; MELNYK, Anastasia. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Revista Mangaio Acadêmico**, v. 1, n. 1, p. 54-61, 2016.

NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere, p. 335-373, 1985

OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) Guideline for testing of chemicals. **Fish, Acute Toxicity Test**, n. 203, p. 1-9, 17 July 1992.

PÁDUA, Juliano Gomes et al. Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa: conservação e uso. 2020.

PMRA. Re-evaluation Note. REV2021-02. Update on the Re-evaluation of Chlorpyrifos. 13 May 2021.

RIBEIRO, Joseph Simões. **Cenário de uso, consumo e classificação de risco dos agrotóxicos na nova fronteira agrícola do Oeste do Pará**. 2021. 140f. Dissertação (Mestrado em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida) - Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2021.

SANTOS, Soraia Baia dos. **Toxicidade aguda do pesticida clorpirifós de formulação comercial em tabaqui (Colossoma macropomum, Cuvier, 1818)**. 2019. 89 f. Dissertação (Dissertação em Biociências) – Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2019.

KUMAR SINGH, B.; WALKER, A.; WRIGHT, D. J. Persistence of chlorpyrifos, fenamiphos, chlorothalonil, and pendimethalin in soil and their effects on soil microbial characteristics. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, p. 181-188, 2002.

SILVA, Susana Maria Sousa da. **Intoxicações por inibidores da Acetilcolinesterase: etiologia, diagnóstico e tratamento**. 2015, 44 f. Dissertação (Mestrado) – Centro Integrado em Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Coimbra, Portugal, 2015.

SUNANDA *et al.* Effects of chlorpyrifos (an Organophosphate Pesticide) in fish. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 9, n. 59, p. 299-305, 2016.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 1: 151 – 173, 1977.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Chlorpyrifos: Preliminary Human Health Risk Assessment for Registration Review**. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. EPAHQ-OPP-2008-0850-0025. June 2011.

VÁSQUEZ, Asunción Pino; RAPOSO, Marta Brezmes. INTOXICACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS. **Protoc diagn ter pediatr**. 1(1):793-801, 2021.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLLETTI. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. Ed. 2, São Carlos: Rima, p. 486, 2008.