UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

LARISSA BROGGIO RAYMUNDO

Avaliação da toxicidade do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio, isolados e em misturas, sobre cladóceros nativos da região Neotropical

SÃO CARLOS – SP

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Avaliação da toxicidade do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio, isolados e em misturas, sobre cladóceros nativos da região Neotropical

Larissa Broggio Raymundo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Odete Rocha

São Carlos – SP

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Larissa Broggio Raymundo, realizada em 01/03/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Odete Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão (UFSCar)

Profa. Dra. Eny Maria Vieira (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

Dedico este trabalho aos meus pais, Valéria e Cal, pelo amor, apoio e incentivo em todos os aspectos da vida, especialmente quanto à minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Dra. Odete pelo apoio, orientação, valiosos ensinamentos e amizade construída desde a iniciação científica.

À CAPES pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de Mestrado.

Aos docentes do PPGERN pelas aprendizagens.

Ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva pela infraestrutura e suporte.

Aos professores Dr. Cleo Leite, Dra. Raquel Aparecida Moreira e Dr. Thandy Junio pelas valiosas contribuições ao trabalho no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Ailton e ao Instituto de Química da UNESP de Araraquara pela realização das análises químicas do pesticida.

À MSc. Caroline Valério Moraes e ao Luís Aparecido Joaquim, pela ajuda nos trabalhos técnicos realizados durante esta pesquisa.

Aos amigos Dra. Mariana Miguel, MSc. Diego Ferreira Gomes e Dra. Adrislaine da Silva Mansano Dornfeld por todo o auxílio durante o trabalho, conselhos e ensinamentos.

Aos amigos do PPGERN Edna, Allan, Ludmilla, Barbara, Thândara, Gabriel, Daniel, Matheus e Enzo (e agregados) por compartilharem experiências, conhecimento e pela amizade.

Aos amigos Diulia, Joice (e Fredinho, que está a caminho), Hevelyn, Camila, Danilo, Mainara, Renan, Naiara e os amigos do ESMC pelos momentos de diversão que tornaram a caminhada mais leve.

Aos meus pais, ao meu irmão Cauã e meu namorado Gabriel por estarem ao meu lado sempre me ouvindo, apoiando, oferecendo amor, cuidado, carinho e incentivo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos compostos tóxicos Clorpirifós e Cádmio, isolados e combinados, sobre os cladóceros nativos da região Neotropical: *Ceriodaphnia silvestrii*, *Ceriodaphnia rigaudi* e *Moina micrura.* Para isso, foram feitoss testes de toxicidade aguda com os compostos isolados e em mistura com *C. silvestrii* e *C. rigaudi* e testes de toxicidade crônica com os compostos isolados para as três espécies estudadas. Foram avaliadas as respostas (*endpoints)* imobilidade para toxicidade aguda e reprodução, crescimento e tamanho dos neonatos para a toxicidade crônica. Adicionalmente foram testadas diferentes vias de exposição aos compostos, para *M. micrura*: via solução-teste, via dieta e ambas simultaneamente. Os testes de toxicidade aguda com o Cádmio resultaram nos valores de CE50-48h de 0,02 mg L^{-1} para *C. rigaudi* e de 0,026 mg L^{-1} para *C. silvestrii*, enquanto os testes com Clorpirifós resultaram em CE50-48h de 0,047 µg L^{-1} e 0,062 µg L^{-1} respectivamente para estas mesmas espécies. O teste com a mistura destes compostos evidenciou a ocorrência de efeitos aditivos para *C. rigaudi*, enquanto para *C. silvestrii* ocorreram efeitos antagônicos dependendo do nível da dose. Na Avaliação de Risco Ecológico (ARE), o Cádmio representou alto risco, enquanto o Clorpirifós representou riscos insignificantes a altos. A reprodução de ambas as espécies expostas ao Clorpirifós foi afetada em todas as concentrações testadas (0,0014, 0,0028, 0,0042, 0,0056, 0,007 e 0,014 µg L^{-1}). A exposição ao Cádmio afetou a reprodução de *C. rigaudi* em todas as concentrações testadas (0,001; 0,003; 0,005; 0,011; 0,016 e 0,022 mg L^{-1}) e *de C. silvestrii* nas concentrações de 0,002, 0,003, 0,005 0,008 e 0,011 mg L^{-1}. O tamanho dos neonatos produzidos por *C. rigaudi* e C. *silvestrii* expostas ao Clorpirifós diminuiu em todas as concentrações testadas. A exposição ao Cádmio também afetou a reprodução diminuindo o tamanho dos neonatos de *C. rigaudi* nas concentrações 0,002, 0,005, 0,008 e 0,011 mg L^{-1} e de *C. silvestrii* em 0,005, 0,011, 0,016 e 0,022 mg L^{-1}. O crescimento de *C. rigaudi,* quando exposta ao Clorpirifós, foi afetado nas concentrações de 0,007 e 0,014 µg L^{-1} e também de *C. silvestrii* em 0,0014, 0,0042, 0,0050, 0,0070 e 0,0140 µg L^{-1}. A exposição ao Cádmio afetou o crescimento de *C. rigaudi* em 0,002, 0,005, 0,008 e 0,011 mg L^{-1} e também de *C. silvestrii* em 0,011, 0,016 e 0,022 mg L^{-1}. Os testes de toxicidade crônica realizados com *M. micrura* exposta ao Clorpirifós revelaram não haver diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle em relação à reprodução, crescimento e atividade alimentar para as concentrações testadas (0,14 e 0,28 µg L-1). Diante do exposto, pode-se concluir que os compostos estudados, tanto isolados como em mistura, causaram toxicidade aos organismos avaliados e, portanto, representam riscos ecológicos potenciais para a biota de ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: Ecotoxicidade. Misturas tóxicas. Toxicidade aguda. Toxicidade crônica. Avaliação de Risco Ecológico.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the effects of isolated and combined concentrations of the compounds Chlorpyrifos and Cadmium on native cladocerans from tropical regions*: Ceriodaphnia silvestrii*, *Ceriodaphnia rigaudi*, and *Moina micrura*. To achieve this, acute toxicity tests were conducted with the isolated compounds and their combinations with *C. silvestrii* and *C. rigaudi.* Chronic toxicity tests were performed, evaluating reproduction, growth, neonate size, and immobility with *C. silvestrii* and *C. rigaudi*. Chronic tests were also conducted through different exposure routes (water, diet, and both) with *M. micrura*. Acute toxicity tests with Cadmium resulted in a 48-hour EC50 of 0.02 mg L^{-1} for *C. rigaudi* and 0.026 mg L^{-1} for *C. silvestrii*. The Chlorpyrifos tests yielded EC50-48h values of 0.047 µg L^{-1} and 0.062 µg L^{-1}, respectively. Tests with mixtures indicated the occurrence of additive effects for *C. rigaudi*, whereas for *C. silvestrii,* antagonistic effects were observed depending on dose level. According to the Ecological Risk Assessment (ERA), Cadmium represented a high risk, while Chlorpyrifos posed insignificant to high risk. Reproduction in both species exposed to Chlorpyrifos was affected at all tested concentrations (0.0014, 0.0028, 0.0042, 0.0056, 0.0070, and 0.0140 µg L^{-1}). Exposure to Cadmium affected the reproduction of both, *C. rigaudi* at all tested concentrations (0.001; 0.003; 0.005; 0.011; 0.016 and 0. mg L^{-1}) and *C*. *silvestrii* at 0.002; 0.003; 0.005; 0.008 and 0.011 mg L^{-1}. Neonate size produced by *C. rigaudi* and *C. silvestrii* exposed to Chlorpyrifos was affected at all tested concentrations. Cadmium exposure affected the neonate size of *C. rigaudi* at concentrations of 0.002; 0.005; 0.008 and 0.011mg L-1 and of *C. silvestrii* at 0.005; 0.011; 0.016 and 0.022 mg L^{-1}. Growth of *C. rigaudi* exposed to Chlorpyrifos was affected at concentrations of 0.007 and 0.014 µg L^{-1}, and of *C. silvestrii* at 0.0014, 0.0042, 0.005, 0.007, and 0.014 µg L^{-1}. Cadmium exposure affected the growth of *C. rigaudi* at 0.002; 0.005; 0.008 and 0.011 mg L^{-1}, and of *C. silvestrii* at 0.011; 0.016 and 0.022 mg L^{-1}. Chronic toxicity tests on *M. micrura* exposed to Chlorpyrifos revealed no significant difference between treatments and the control group in terms of reproduction, growth, and feeding activity at the tested concentrations (0.14 and 0.28 µg L^{-1}). In conclusion, both the isolated compounds and their combinations exhibited toxicity to the evaluated organisms, posing potential ecological risks to the biota of aquatic environments.

Key-words: Ecotoxicity; Toxic Mixtures; Acute Toxicity; Chronic Toxicity;

Ecological Risk Assessment.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Introdução Geral, Objetivos e Hipóteses

Figura 1 – Vista geral do cladócero *Moina micrura* 28

Figura 2 - Mapa de ocorrência e distribuição de *Moina micrura* *28*

Figura 3 - Vista geral do cladócero *Ceriodaphnia rigaudi* *29*

Figura 4 - Mapa de ocorrência e distribuição de *Ceriodaphnia rigaudi* 29

Figura 5 - Vista geral do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* *30*

Figura 6 - Mapa de ocorrência e distribuição de *Ceriodaphnia silvestrii* 30

Capítulo 2. Efeitos da toxicidade aguda do agrotóxico Clorpirifós e do composto metálico Cloreto de Cádmio, tanto isolados como em misturas, sobre duas espécies de cladóceros nativos neotropicais

Figura 1 - Curva de Distribuição da Sensibilidade das Espécies (SSD) de anfíbios, crustáceos, peixes e rotíferos ao metal Cádmio.....49

Figura 2 - Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD) de anfíbios, crustáceos, peixes e rotíferos ao agrotóxico Clorpirifós.....50

Figura 3 - Isobolograma dos efeitos de mistura do metal Cádmio e do agrotóxico Clorpirifós para o cladócero *Ceriodaphnia rigaudi* evidenciando o ajuste ao modelo de referência de Adição da Concentração (CA), sem ocorrência de desvios em decorrência de interações.....52

Figura 4 - Isobolograma dos efeitos de misturas do metal Cádmio e do agrotóxico Clorpirifós para o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* evidenciando o ajuste ao modelo de referência de Ação Independente (IA), com desvio dependente do nível da dose (DL), ocorrendo antagonismo nas concentrações mais baixas de Cádmio.....53

Capítulo 3. Efeitos de toxicidade crônica do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio sobre os cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* e *C. rigaudi*

Figura 1 - Número médio de neonatos produzidos por fêmea.....78

Figura 2 - Crescimento médio dos neonatos.....79

Figura 3 - Tamanho médio dos neonatos produzidos por fêmea.....80

Capítulo 4. Efeitos da Exposição Crônica de *Moina micrura* ao Clorpirifós em Diferentes Vias de Exposição

Figura 1 - Faixa de sensibilidade de *Moina micrura* ao Cloreto de Sódio (NaCl) em 20 testes de toxicidade aguda (carta-controle).....93

Figura 2 – Número médio de neonatos produzidos por fêmea em cada tratamento.....94

Figura 3 - Crescimento médio dos organismos em cada tratamento.....95

Figura 4 – Saldo final da Concentração de alga em cada tratamento.....96

Figura 5 - Número de organismos imóveis em cada tratamento.....97

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. Introdução Geral, Objetivos e Hipóteses

Tabela 1 - Comparação entre valores máximos de metais permitidos pelo CONAMA e valores reais encontrados na literatura.....16

Capítulo 2. Efeitos da toxicidade aguda do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio, tanto isolados como em misturas, sobre duas espécies de cladóceros nativos neotropicais

Tabela 1 - Valores de CE50-48h para *Ceriodaphnia. rigaudi* encontrados em cada exposição ao metal Cádmio e ao agrotóxico Clorpirifós isoladamente 48

Tabela 2 - Valores de CE50-48h para *Ceriodaphnia silvestrii* encontrados em cada exposição ao metal Cádmio e ao agrotóxico Clorpirifós isoladamente.....48

Tabela 3 - Valores de HC5, HC50 e seus intervalos de confiança (95%) para as espécies incluídas nas SSDs.....50

Tabela 4 - Risco ambiental do metal Cádmio e do agrotóxico Clorpirifós expressos como quociente de risco ecológico (RQ), com base na concentração de perigo até 5% (HC5) das espécies incluídas nas SSDs.....51

Capítulo 3. Efeitos de toxicidade crônica do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio sobre os cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* e *C. rigaudi*

Tabela 1 - Valores de CE10 e CE20 obtidos para *Ceriodaphnia rigaudi* e *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao Cádmio e ao Clorpirifós.....80

SUMÁRIO

1. Introdução Geral, Objetivos e Hipóteses

1.1 Introdução 13

1.2. Produtos químicos no ambiente aquático 13

1.2.1 Misturas 18

1.2.2. Substâncias químicas utilizadas no estudo 19

1.2.2.1 Clorpirifós 19

1.2.2.2 Cádmio 21

1.2.2.3 Mistura: Clorpirifós e Cádmio 23

1.3.Testes Ecotoxicológicos 25

1.3.1.1.1. Vias de contaminação 26

1.3.1.1.2. Organismos-teste 26

1.4. Avaliação de Risco Ecológico 30

1.5 Objetivos 31

1.5.1 Objetivo geral 31

1.5.2 Objetivos específicos 31

1.6. Hipóteses 32

Referências 33

2. Efeitos da toxicidade aguda do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio, tanto isolados como em misturas, sobre duas espécies de cladóceros nativos

1. Introdução 40
2. Metodologia 42
   - 2.1 Cultivo e Manutenção dos organismos-teste 42
   - 2.2 Compostos químicos utilizados 43
   - 2.3 Testes de toxicidade aguda 44
   - 2.4 Análise de dados 45
   - 2.5 Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD) 45
   - 2.6 Avaliação de Risco Ecológico 46
3. Resultados 47
   - 3.1 Quantificação das substâncias 47
   - 3.2 Testes de toxicidade aguda 47
   - 3.3 Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD) 48
   - 3.4 Avaliação de Risco Ecológico 51
   - 3.5 Testes em mistura 51
4. Discussão 53
5. Conclusões 56

Referências 57

3. Efeitos de toxicidade crônica do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio sobre os cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* e *C. rigaudi*

1. Introdução 73
2. Metodologia 74
   - 2.1 Cultivo e manutenção dos organismos-teste 74
   - 2.2 Compostos químicos utilizados 75
   - 2.3 Testes de toxicidade crônica 76
   - 2.4 Análise de dados 77
3. Resultados 77
4. Discussão 81
5. Conclusões 83

Referências 83

4. Efeitos da Exposição Crônica de *Moina micrura* ao Clorpirifós em Diferentes Vias de Exposição

1. Introdução 86
2. Metodologia 88
   - 2.1 Cultivo e manutenção dos organismos-teste 88
   - 2.2 Compostos químicos utilizados 89
   - 2.3 Testes de toxicidade aguda com o composto de referência 90
   - 2.4 Testes de toxicidade crônica ao Clorpirifós 90
   - 2.5 Análise de dados 92
3. Resultados 92
   - 3.1 Testes de sensibilidade ao composto de referência 92
   - 3.2 Testes de toxicidade crônica ao Clorpirifós 93
4. Discussão 97
5. Conclusões 99

Referências 99

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL, OBJETIVOS E HIPÓTESES

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos químicos no ambiente aquático

Todos os seres vivos dependem da água para sua sobrevivência e desenvolvimento. Apesar disso, fatores como o crescimento da população humana, o grau de urbanização, e os usos múltiplos da água, estão causando cada vez mais a degradação e poluição desse recurso natural (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2011).

Somados ao crescimento populacional e urbanização, a busca contínua pela melhoria da qualidade de vida, longevidade, produtividade e lucratividade levaram a humanidade a recorrer a tecnologias e práticas desvinculadas de comprometimento com a qualidade e preservação do meio ambiente. Um exemplo disso foi a modernização e ampliação da produção agrícola, ocorrida no século passado e conhecida como a “revolução verde”, que trouxe com ela um dos problemas ambientais mais difundidos do século, a eutrofização e a contaminação das águas epicontinentais e subterrâneas pelos agrotóxicos (DUTRA; SOUZA, 2017).

Apesar de beneficiar as lavouras livrando-as das pragas - definidas como “plantas ou animais que comprometem nossa alimentação, saúde e/ou conforto”, o uso de agrotóxicos pode levar à destruição da biodiversidade (MAHMOOD et al., 2016). Isso acontece porque o agrotóxico afeta não só os organismos-alvo, mas também outros organismos que entram em contato com o composto através da cadeia trófica ou pela contaminação do meio em que vivem (BOUDH; SINGH, 2019).

A denominação “agrotóxicos” é controversa e vem sendo debatida há mais de três décadas. O dicionário da língua portuguesa registra as cinco denominações: defensivos agrícolas - uma vez que é utilizado no combate às pragas; biocidas - pois são tóxicos capazes de eliminar formas de vida;

pesticidas - por influência da língua inglesa; praguicidas - por influência da língua espanhola; e agrotóxicos - termo introduzido pelas legislações brasileiras (LARA; BATISTA, 1992),

Os agrotóxicos são classificados em diferentes categorias, dependendo de seu alvo, podendo ser herbicidas, inseticidas, raticidas, moluscicidas e nematicidas (MAHMOOD et al., 2016). Dentro dos inseticidas, temos os benzoilureias, que atuam regulando o crescimento dos insetos e interferindo na formação de quitina; os carbamatos, que possuem espectro de ação amplo, sendo eficazes contra larvas de lepidópteros e pragas ornamentais; os organoclorados, que também possuem amplo espectro de ação, mas devido à alta persistência e toxicidade, a maioria foi banido ou teve seu uso restrito; os organofosforados, que possuem ação bastante específica, baixa persistência e alta eficácia; e os piretroides, inseticidas naturais extraídos das flores de certas espécies de crisântemo que afetam o sistema nervoso dos insetos (TADEO; SANCHEZ-BRUNETE; GONNZALEZ, 2008).

No Brasil, entre os anos de 2014 e 2021, o Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), órgão pertencente ao Ministério da Saúde, encontrou valores acima dos máximos permitidos (VMP) para 25 agrotóxicos. Entre eles, em 3 das análises realizadas o 2,4-D (VPM = 30 μg L^{-1}), em 24 análises a Atrazina (VMP = 2 μg L^{-1}), em 6 análises o Carbofurano (VMP = 7 μg L^{-1}), em 4 análises o Clorpirifós (VMP = 30 μg L^{-1}), em 48 análises o DDT (VMP = 1 μg L^{-1}) e em 16 análises o Glifosato (VMP = 500 μg L^{-1}) (BRASIL, 2023).

Os efeitos desses estressores ambientais para a biota podem ser vistos em diferentes níveis de organização. Em nível abaixo de organismo completo podem ser observados efeitos biomoleculares, bioquímicos e fisiológicos, em nível individual pode ocorrer alterações histopatológicas, bioenergéticas e na reprodução, e em nível populacional podem ser observadas alterações no crescimento, na estrutura e no sucesso da população (ADAMS; GREELEY, 2000).

Em nível abaixo de organismo completo e populacional, o trabalho de Moreira e colaboradores (2020), que expuseram a microalga *R. subcapitata* aos

agrotóxicos fipronil e 2,4-D, isolados e em mistura. Para o fipronil de forma isolada, os autores encontraram alterações na densidade e tamanho celular, na produção de clorofila a, nas classes lipídicas (sendo estas três alterações a nível abaixo de organismo completo) e na taxa de crescimento populacional (nível populacional). Para o 2,4-D de forma isolada, os autores também verificaram alterações na produção de clorofila a, nas classes lipídicas e no tamanho celular. Para a mistura destes agrotóxicos, os autores verificaram alterações em todas as variáveis testadas (MOREIRA et al., 2020).

Após expor o lagostim *Cherax destructor* ao herbicida Atrazina, Stara et al. (2018) observaram hipertrofia, fragmentação, formação de pseudocisto e desintegração do epitélio nos tecidos das brânquias e hepatopâncreas do organismo sendo estas, alterações em nível individual.

Os seres humanos não estão excluídos dos efeitos causados pelos agrotóxicos. Foram encontrados inseticidas organoclorados no leite materno de mulheres residentes de áreas rurais e urbanas no Brasil (SANT'ANA; VASSILIEFF; JOKL, 1989), resíduos dos agrotóxicos Clorpirifós e Piributicarbo no sangue de trabalhadores envolvidos com sua aplicação no Paquistão (HAYAT et al., 2010) e níveis relativamente altos de DDT e HCH em tecidos adiposos humanos na China (WANG et al., 2011). São dados preocupantes, uma vez que essas substâncias podem causar doenças respiratórias crônicas, câncer e danos a órgãos como cérebro, pulmões e rins (KUMAR et al., 2020).

Os ecossistemas aquáticos são particularmente vulneráveis devido aos diferentes meios em que os agrotóxicos podem estar presentes como, resíduos de sistemas agrícolas, aplicação aérea, aplicação externa e interna, erosão do solo e consequente transferência de agrotóxicos adsorvidos ao mesmo, queda de poeira carregando resíduos adsorvidos, chuvas levando ao escoamento dos agrotóxicos, o próprio escoamento levando a infiltração do pesticida aos lençóis freáticos e poluição do ar devido à alta volatilidade dos mesmos (EL-NAHHAL; EL-NAHHAL, 2021).

Além dos agrotóxicos, os ecossistemas aquáticos são poluídos por um grande número de substâncias tóxicas. Outros poluentes preocupantes são os metais potencialmente tóxicos, termo que se refere a metais e metaloides

associados a toxicidade potencial no meio ambiente (POURRET et al., 2021). Esses metais contaminam o ambiente através de resíduos de mineração, lixiviação de aterros sanitários, escoamento urbano e resíduos industriais (GAUTAM et al., 2014). Uma vez no ambiente aquático, são distribuídos por toda a coluna d'água, acumulando-se nos sedimentos e sendo consumidos pelos organismos (SONONE et al., 2020). O acúmulo de metais nos organismos depende principalmente das concentrações nas presas, da absorção química, da cinética de eliminação e da concentração do metal no ambiente (QIU, 2015).

No Brasil há o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), órgão consultivo e deliberativo do Sistema Nacional do Meio Ambiente que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2023). Na Tabela 1, a seguir observa-se o valor máximo permitido para os metais com base na resolução do CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005) e os valores máximos descritos para rios brasileiros encontrados no levantamento de Pereira (2021).

Tabela 1 - Comparação entre os valores máximos de metais permitidos pelo CONAMA e os valores reais encontrados na literatura.

Metal	**Valor máximo CONAMA (mg L^{-1})**	**Valor encontrado (mg L^{-1})**	**Rio**	**Referência**
Alumínio	0,1	2542	Rio Laranjinha e Ribeirão das Pedras	(GALHARDI; BONOTTO, 2016)
Cádmio	0,001	0,813	Rio Cassiporé	(LIMA et al., 2015a)
Chumbo	0,01	2,16	Rio Doce	(GOMES et al., 2019)
Cobre	0,009	1,03	Rio Cassiporé	(LIMA et al., 2015a)
Ferro	0,03	2824	Rio Laranjinha e	(GALHARDI;

			Ribeirão das Pedras	BONOTTO, 2016)
Níquel	0,025	0,43	Rio Sergipe	(COSTA, 2018)
Manganês	0,1	6,126	Rio da Ponte, Ouro Preto	(GUIMARÃES-SILVA et al., 2007)
Mercúrio	0,01	0,15	Rio Cassiporé	(LIMA et al., 2015a)
Zinco	0,18	76,185	Ecorregião aquática Xingu	(CASTILHOS et al., 2012)

Como os metais não podem ser degradados, eles tendem a ser bioacumulados, fato que os tornam bastante perigosos (BABY et al., 2011). Qiu (2015) estudou a transferência trófica de cobre, zinco, cádmio e chumbo nos ecossistemas marinhos - representados pela água do mar, sedimentos, recifes de corais, fitoplâncton, macrófitas, camarões, caranguejos, moluscos e peixes, e nos ecossistemas de maricultura - representados pela ração, peixe lixo, pompo e pargo. Este autor determinou a concentração dos metais no fitoplâncton, macrófitas, ração e nos peixes planctívoros, calculando os fatores de transferência e chegou à conclusão de que o cobre era capaz de biomagnificação na comunidade bentônica de ecossistemas marinhos e que os peixes em cultivo biomagnificaram as concentrações de chumbo, mas não as de cobre, zinco e cádmio (QIU, 2015).

Ali et al. (2020) encontraram chumbo, cádmio, crômio e arsênico acumulados acima da concentração máxima tolerável em seis espécies de peixes no rio Karnaphuli - Bangladesh, indicando alto risco de contaminação devido ao consumo dos mesmos pela população. Da mesma forma, Hashemi (2018) encontrou chumbo, cádmio, mercúrio, cobre e zinco nos músculos, fígado e rim bovinos, sendo que o chumbo e o cádmio excederam os limites máximos europeus.

Níveis de metais com potencial tóxico já foram encontrados também em humanos, como evidenciado no estudo de Erie et al. (2005) que encontraram chumbo e cádmio em olhos humanos, e no estudo de Ni et al. (2018) que encontraram arsênio, cádmio, chumbo e níquel em cordões umbilicais, inclusive associando-os às fendas orofaciais - uma anomalia congênita comum. A toxicidade dos metais para os humanos, assim como para outros mamíferos, se deve à reatividade química dos íons com proteínas estruturais celulares, enzimas e sistemas de membrana, podendo causar problemas pulmonares, renais, na pele e no sistema nervoso (MAHURPAWAR, 2015).

Apesar da existência de estudos na literatura que avaliaram a toxicidade destes compostos a alguns organismos de forma isolada, poucos trabalhos avaliaram suas misturas, e esse número é ainda mais escasso quando se trata de organismos-teste nativos de ambientes tropicais.

1.2 Misturas

Poluentes oriundos de diferentes atividades humanas ocorrem juntos no ambiente constituindo misturas complexas que podem provocar interações aditivas - somatória dos efeitos individuais; sinérgicas - quando o efeito dos estressores juntos é maior do que a soma dos efeitos individuais, ou antagônicas - quando o efeito dos estressores juntos é menor do que a soma dos efeitos individuais (BLISS, 1939; FOLT et al., 1999; LOUREIRO et al., 2010). WALLACE & DJORDJEVIC (2020) ressaltam a importância de estudos de toxicidade de misturas, uma vez que o produto químico individual pode não ser carcinogênico, mas pode ser um “cocarcinógeno”, também chamado de agente de toxicidade passiva, que facilita a carcinogênese na presença de um segundo composto.

De acordo com (PAVLAKI et al., 2011), o uso de misturas binárias em testes ecotoxicológicos fornecem informações que nos permitem avaliar e tentar prever a forma como os químicos agem juntos, bem como os possíveis efeitos que podem causar aos organismos e ao funcionamento do sistema como um todo.

Com o intuito de explicar o comportamento das misturas foram desenvolvidos modelos teóricos baseados em dois conceitos de referência que

preveem a toxicidade da mistura com base nas toxicidades individuais dos componentes na mesma, assumindo que não há interação entre os compostos (MANSANO et al., 2017; MIGUEL, 2020). O Modelo da Adição de Concentração (*Concentration addition* - CA) assume que compostos com o mesmo modo de ação agem sobre o mesmo sistema biológico de forma a produzir uma resposta comum em proporção a sua toxicidade relativas PEREZ et al. (2011). Já o Modelo de Ação Independente (*Independent action* - IA) assume que os compostos afetam os organismos por diferentes mecanismos de ação e portanto, que seus efeitos independem um do outro (BLISS, 1939 & PÉREZ et al., 2011). Quando o modo de ação dos compostos não é conhecido, se escolhe o modelo que melhor se ajusta aos dados (PAVLAKI et al., 2011).

A partir da interação de dois compostos químicos pode ocorrer ou não desvios. Quando ocorrem, podem ser sinergismo ou antagonismo, sendo dependentes do nível da dose (*Dose level* - DL) ou da proporção da dose (*Dose ratio* - DR) (MANSANO et al., 2017). Esses desvios podem ser determinados a partir dos modelos, utilizando-se a ferramenta MIXTOX (MANSANO et al., 2017; PÉREZ et al., 2011).

1.3 Substâncias químicas utilizadas no presente estudo

1.3.1 Clorpirifós (CPF)

O Clorpirifós (*O, O-diethyl O-3,5, 6-trichloro-2-pyridinyl phosphorothioate*), de fórmula química C9H11Cl3NO3PS (CAS: 2921-88-2), é um inseticida organofosforado com as seguintes características: sólido cristalino de coloração transparente a branca, odor mercaptano suave, ponto de fusão 41,5–42,5°C, ponto de ebulição 0,300°C, pressão de vapor 3,35mPa a 25°C, densidade 1,51g ml^{-1} a 21°C, peso molecular 350,6, baixa solubilidade em água (K_{ow} = 50,000) (TESTAI; BURATTI; DI CONSIGLIO, 2010) e alta afinidade por matéria orgânica (K_{oc} = 6070 mL g^{-1}) (MORRO; SCHNITZLER, 2021). Sua meia vida em águas superficiais é inferior a 7 dias, dado que se dissipa e tende a migrar para sedimentos, enquanto no solo possui meia vida de 60 a 120 dias (TESTAI et al., 2010).

O composto atua inibindo a enzima colinesterase nos sistemas nervoso central e periférico, resultando em um acúmulo de acetilcolina que promove a neurotoxicidade em animais (ZHAO; DOURSON; GADAGBUI, 2006). Dessa forma, é utilizado no controle de baratas, pulgas, carrapatos e outras pragas, com aplicações residenciais e na horticultura, agricultura e silvicultura (TESTAI; BURATTI; DI CONSIGLIO, 2010). No Brasil, é autorizada a utilização nas culturas de algodão, amendoim, aveia, batata, café, centeio, cevada, citros, ervilha, feijão, grão-de-bico, lentilha, maçã, milho, pastagem, soja, sorgo, trigo e tomate (ANVISA, 2021).

Em 2021, seu uso nos alimentos foi proibido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA) a fim de proteger a saúde pública devido ao seu potencial risco neurotóxico, uma vez que foi associado a possíveis efeitos neurológicos em crianças (U.S. EPA, 2021). Na Europa, a aprovação expirou em 2020 e não foi renovada, na Austrália, está em processo de reavaliação, no Canadá, a reavaliação foi encerrada em 2021 cancelando todos os usos e produtos à base de Clorpirifós (ANVISA, 2022).

Apesar de ter sido banido em diversos países desenvolvidos, ainda é amplamente utilizado em países em desenvolvimento (FOONG et al., 2020). No Brasil, além do uso agrícola já citados anteriormente, está autorizado o uso no controle de formiga apenas na forma de isca granulada, domissanitário na forma de iscas em embalagens porta-iscas com dispositivo de segurança e na concentração máxima permitida de 1% p/p, e como preservante de madeira para o tratamento de madeiras destinadas a dormentes, postes, cruzetas, mourões para cercas rurais, esteios e vigas (ANVISA, 2021).

Além dos insetos, sua toxicidade já foi relatada para diversos grupos. Tato e Beiras (2019) expuseram a microalga *Tisochrysis lutea* ao Clorpirifós e observaram a inibição de seu crescimento com uma CE50 de 246,3 µg L^{-1}. Mustafa et al. (2011) expuseram a aranha *Lycosa terrestris* e observaram valores de DL50 (80 µl) menores do que as concentrações medidas em campo. Patetsini et al. (2013) expuseram o mexilhão *Mytilus galloprovinciallis* a concentrações ambientais de clorpirifós e observaram a resposta dos animais por meio do biomarcador NRR - retenção de corante vermelho neutro que indica a estabilidade da membrana lisossômica dos hemócitos, encontrando uma CE50

de 0,34 µg L^{-1}. Sotomayor et al. (2012) expuseram continuamente embriões do anfíbio *Rinella arenarum* e observaram os diferentes estágios, encontrando uma CL50-48h de 23,3 mg L^{-1} no estágio de broto de cauda, CL50-120h de 14,3 mg L^{-1} no estágio de batimento cardíaco e CL50-144h de 13,5 mg L^{-1} no estágio do opérculo completo. Farag et al. (2003) avaliaram a toxicidade do Clorpirifós no desenvolvimento de ratas Fischer, expondo as fêmeas a doses diárias de 5, 10 e 15 mg kg^{-1} entre o 6º e 15º dia de gestação, observando nas duas maiores dosagens a redução de peso materno e fetal, diminuição da viabilidade fetal e aumento de efeitos teratogênicos como variações viscerais, esqueléticas e externas.

1.3.2 Cádmio (Cd)

O cloreto de cádmio ($CdCl_2$) é um metal bastante preocupante pois, ao contrário de outros como cobre e zinco, o cádmio não é essencial para os sistemas biológicos e, mesmo em baixas concentrações, este metal pode ser altamente tóxico (GAUTAM et al., 2014). Além disso, o cádmio se liga a proteínas em muitos tecidos, com maior concentração nos rins, brânquias e fígado, no exoesqueleto de crustáceos e nas raízes de plantas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992).

O elemento químico é naturalmente liberado no ambiente por processos como intemperismo e erupções vulcânicas, porém há um aumento rápido e constante devido a atividades humanas como mineração, galvanoplastia, tintas, corantes e fabricação de baterias(SOBHA et al., 1970).

Segundo a resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005), o valor máximo de cádmio nas águas doces deveria ser 0,001 mg L^{-1}. Porém, os valores máximos medidos nos rios brasileiros foram superiores a este limite, como verificado no Rio São Francisco com 0,02 mg L^{-1} (RIBEIRO et al., 2012), Rio Tapajós com 0,004 mg L^{-1} (OLIVEIRA; FRANÇA; ROCHA, 2015) e Rio Cassiporé com 0,8 mg L^{-1} (LIMA et al., 2015).

A toxicidade do cádmio é conhecida para inúmeros organismos, afetando o crescimento e a reprodução de invertebrados aquáticos e microrganismos, interagindo com o cálcio e causando hipocalcemia em peixes, além de afetar o crescimento, abertura estomática, transpiração e fotossíntese em plantas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992).

Após exposição ao cloreto de cádmio, Yılmaz e colaboradores (2004) observaram toxicidade aguda (CL50-96hde 30,4 mg L-1) para o peixe *Poecilia reticulata*, bem como alterações comportamentais como nadar de modo desequilibrado, rotacionar o corpo, se prender à superfície, dificuldade de respirar e se juntar ao redor do filtro de ventilação. Selvi e colaboradores (2003) expuseram a rã *Rana ridibunda* e observaram toxicidade aguda (CL50-96h) de 51,2 mg/L e alterações comportamentais que variaram conforme a dose, como nadar perto da superfície, dificuldade respiratória, lentidão de movimentos, perda de equilíbrio, aumento de secreção e muco. Padmanaban e Mohan (2013) expuseram o caranguejo *Paratelphusa hydrodromous* ao cloreto de cádmio e encontraram uma CL50 de 156,68 ppm e alterações comportamentais como a diminuição da atividade locomotora, do movimento e da limpeza das partes bucais, enquanto houve um aumento de movimentos erráticos das antenas. Banaae et al. (2018), após exposição da alga *Spirogyra sp.* ao cloreto de cádmio, encontraram citotoxicidade na concentração de 1 mg L^{-1}, bem como aumento da atividade das enzimas catalase, ascorbato peroxidase e elevados elevado malondialdeído, mas com redução do teor de clorofila e dos níveis de carotenoides.

Os efeitos do cádmio também são observados nos seres humanos, que podem apresentar falência renal, hiperatividade, amolecimento dos ossos, crescimento lento, dores musculares e câncer (SONONE et al., 2020). O cádmio também foi a causa de um dos maiores desastres ambientais conhecidos no Japão, que afetou moradores das proximidades do rio Jinzu, na prefeitura de Toyama. Minas próximas ao rio contaminaram suas águas, o solo e a agricultura local com os metais chumbo, zinco e cádmio, o que desencadeou a doença de itai-itai - uma grave intoxicação crônica causada por metais, principalmente o cádmio, causando osteomalácia e osteoporose (AOSHIMA, 2012).

1.3.3 Mistura: Clorpirifós e Cádmio

Poucos estudos avaliaram a mistura entre o sal cloreto de cádmio e o agrotóxico clorpirifós. Dentre eles foram encontrados tanto efeitos antagônicos, quanto efeitos sinérgicos.

Yu e colaboradores (2019) avaliaram a toxicidade do cloreto de cádmio e quatro agrotóxicos (clorpirifós, atrazina, lambda-cialotrina e abamectina) em misturas binárias, ternárias, quaternárias e quinquenárias para o oligoqueto *Eisenia fetida*. Para a mistura binária cloreto de cádmio-clorpirifós foi obtida uma CE50-24h de 26,8 mg a.i. cm^{-2}, com índice aditivo de -0,34 e CE50-48h de 5,51 mg a.i. cm^{-2}, com índice aditivo de 0,06, resultados que sugerem antagonismo e que a toxicidade está relacionada ao tempo de exposição. Para as misturas ternárias de cloreto de cádmio-atrazina-clorpirifós, cloreto de cádmio-clorpirifós-lambda-cialotrina e cloreto de cádmio-clorpirifós-abamectina, estes autores observaram antagonismo. Na mistura quaternária cloreto de cádmio-atrazina-clorpirifós-abamectina também foi observado antagonismo, enquanto nas misturas cloreto de cádmio-atrazina-clorpirifós-lambda-cialotrina e cloreto de cádmio-clorpirifós-lambda-cialotrina-abamectina foi observado sinergismo. por fim, na mistura quinquenária e cloreto de cadmio-atrazina-clorpirifós- lambda-cialotrina-abamectina, os autores observaram efeitos sinérgicos (YU *et al.*, 2019).

Xu et al. (2017) avaliaram a toxicidade do cádmio e clorpirifós no fígado de ratos após exposição subcrônica. Os autores administraram aos ratos três doses diferentes de clorpirifós, cádmio e sua mistura oralmente durante 90 dias. Após o tratamento, realizaram exames histopatológicos e bioquímicos. Foi verificado que o peso do fígado dos ratos não mudou com a exposição, porém o órgão apresentou degeneração vacuolar, hemorragia e dilatação de sinusoides. Além disso, houve diminuição da atividade da enzima catalase, aumento de carbonilas proteicas e aumento dos níveis de malondialdeído, em que o efeito da mistura foi menor que os efeitos individuais, sugerindo que houve antagonismo. Também houve alterações em 25 metabólitos hepáticos, sendo três metabólitos identificados apenas no grupo tratado com mistura, indicando que a mistura induziu alterações únicas no fígado. Estes pesquisadores observaram que a concentração de clorpirifós diminuiu nos ratos tratados com a

mistura em comparação aos que foram tratados somente com clorpirifós, o que sugere que o cádmio acelerou a degradação do clorpirifós no fígado dos mesmos (XU et al., 2017).

A toxicidade pulmonar induzida por cloreto de cádmio, clorpirifós e sua mistura foi avaliada em machos de ratos *Wistar* albinos, por Yadala et al (2020). Os ratos foram separados em quatro grupos: controle, um ao qual administraram somente cloreto de cádmio (22,5 mg kg^{-1} b.wt), um em que administraram somente clorpirifós (25 mg kg^{-1} b.wt) e um em que administraram a mistura (22,5 mg kg^{-1} b.wt de cloreto de cádmio + 25 mg kg^{-1} b.wt de clorpirifós), via oral diariamente, durante 28 dias. Os resultados mostraram congestões leves a moderadas nos grupos tratados com os compostos isolados, enquanto variaram de moderadas a graves no grupo exposto à mistura. No grupo tratado somente com Cloreto de Cádmio, as seções pulmonares apresentaram hemorragias com infiltração de linfócitos, hiperplasia leve, células epiteliais dos brônquios descamadas e linfoides peribrônquicos e perivasculares agregados. No grupo tratado somente com Clorpirifós, as seções pulmonares apresentaram exsudato e descamação epitelial das células no lúmen do bronquíolo secundário, alvéolos enfisematosos com perda da arquitetura de epitélio alveolar, edema intersticial com infiltração de linfócitos e leve hiperplasia das células do epitélio brônquico. Já no grupo tratado com a mistura, foram observadas lesões semelhantes aos grupos isolados com maior intensidade, sugerindo o efeito sinérgico dos componentes (YADALA et al., 2020).

Chen e colaboradores (2013) avaliaram o efeito do cloreto de cádmio e clorpirifós em células hepáticas humanas (linha Hep G2). Para estudar o efeito em mistura, os autores administraram 10 μM de cada composto, concentração em que nenhum deles causou danos isoladamente. Porém, a exposição à mistura causou grande comprometimento, com cerca de 50% de redução na viabilidade celular em comparação com o controle ou tratamentos individuais. No tratamento com a mistura também foram observadas outras diferenças em relação ao controle ou nos tratamentos isolados, como alterações morfológicas (arredondamento da célula e diminuição de tamanho celular), aumento de espécies reativas de oxigênio, de malondialdeído, da atividade da enzima glutationa peroxidase e do nível de lactato desidrogenase. Esses resultados

sugerem que o tratamento concomitante de Cloreto de Cádmio e Clorpirifós levam ao comprometimento sinérgico dos hepatócitos.

1.4 Testes Ecotoxicológicos

Testes ecotoxicológicos são realizados para determinar concentrações específicas de compostos químicos que induzem efeitos aos organismos. Os primeiros testes realizados com organismos aquáticos datam de 1920, enquanto uma padronização só foi realizada entre 1940-1950 devido aos pesquisadores relatarem diferentes resultados quando utilizavam diferentes métodos (ARAGÃO; ARAUJO, 2014). Atualmente, há ensaios padronizados por associações nacionais e internacionais, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) e a *US Environmental Protection Agency* (USEPA).

Essas padronizações levam em consideração fatores que podem influenciar a toxicidade dos compostos como, fatores ambientais (temperatura, pH, dureza, condutividade, oxigênio dissolvido) e características da espécie testada (estágio de vida, sensibilidade e pré-exposição) (MOHAMMED, 2013). Por isso, antes de conduzir testes de toxicidade é importante ter o controle de condições ambientais e selecionar espécies adequadas.

Os testes podem ser de toxicidade aguda ou crônica. Os testes de toxicidade aguda com cladóceros avaliam a mobilidade dos organismos expostos a amostras líquidas durante 48 horas (ABNT, 2016). Já os testes de toxicidade crônica avaliam a inibição da reprodução e a sobrevivência dos organismos expostos durante sete dias (ABNT, 2017).

Para garantir que os organismos estão saudáveis e que a metodologia está sendo empregada corretamente, antes dos testes com os compostos a serem estudados realizam-se testes de toxicidade com uma substância de referência, que possui valores de CE50 conhecidos para a espécie selecionada, e dessa forma, permitem comparar dados obtidos em diferentes locais (ZAGATTO, 2014). A substância de referência a ser utilizada depende do objetivo do estudo e da espécie a ser testada.

1.5 Vias de contaminação

Os testes ecotoxicológicos geralmente são usados para analisar a exposição dos contaminantes dissolvidos no meio aquático. No entanto, é importante notar que a biota aquática pode acumular substâncias tóxicas que estão dissolvidas na água ou associadas à sua dieta (SOFYAN et al, 2006). É relevante destacar que as regulamentações ambientais frequentemente não levam em consideração a exposição por meio da alimentação (WILDING & MALTBY, 2006). Em alguns estudos, foram observados efeitos letais e subletais em organismos expostos a contaminantes por meio da ingestão de alimentos. Por exemplo, Sofyan et al. (2006) examinaram a sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia* que se alimentou de *Pseudokirchneriella subcapitata* contaminada com Cádmio e Cobre, resultando em efeitos prejudiciais em relação à taxa de alimentação, sobrevivência e reprodução deste organismo. Da mesma forma, WILDING & MALTBY (2006) investigaram a sensibilidade de *Gammarus pulex* ao Zinco, seja através da dieta, da água ou de ambas as vias observando uma maior mortalidade e taxa de alimentação reduzida quando ambas as vias foram contaminadas. GEFFARD et al. (2008) conduziram estudos sobre a sensibilidade de *Daphnia magna* ao Cádmio, tanto por meio da alimentação quanto da água, obtendo resultados prejudiciais para a reprodução e efeitos aditivos quando houve exposição em ambas as vias.

1.6 Organismos-teste

Os critérios para selecionar as espécies a serem testadas devem: ter ampla disponibilidade, facilidade em serem mantidas em cultivo de laboratório; ter genética e história conhecidas; ser as mais sensíveis do ambiente, ser importantes recreativa, ecológica e comercialmente, ter boas condições fisiológicas e representar o ecossistema que está sendo estudado (DOMINGUES & BERTOLETTI, 2014; MOHAMMED, 2013).

As espécies de cladóceros planctônicos são muito utilizados como organismos-teste por cumprirem os critérios descritos, além de serem um dos grupos mais sensíveis aos contaminantes e ocuparem uma posição de extrema importância na cadeia alimentar (HANAZATO, 2001). Especialmente as espécies da subordem Cladocera são bastante utilizadas por possuírem ciclo de

vida curta facilitando o cultivo em laboratório, reprodução partenogenética garantindo que os organismos sejam geneticamente idênticos e tamanho pequeno, reduzindo a quantidade de água de diluição utilizada nos testes (COSTA et al., 2008).

As regulamentações sobre descarte de produtos químicos no ambiente aquático são, em sua maioria, baseadas em dados obtidos por meio de de testes realizados com espécies endêmicas da Europa e América do Norte (LAMEIRA, 2008). Portanto, é necessário conhecer a sensibilidade de espécies tropicais uma vez que os testes diferem em características específicas de cada região, como pH, temperatura e dureza da água. Ademais, a utilização de espécies nativas proporciona maior representatividade para as pesquisas brasileiras (KRULL ; BARROS, 2012; MARTINS ; BIANCHINI, 2011), uma avaliação mais realista sobre a sensibilidade das espécies locais, facilita a logística e evita a introdução de espécies exóticas no ambiente (FREITAS ; ROCHA, 2011; MANSANO et al., 2018).

Levando em consideração as características anteriormente citadas, as espécies selecionadas para serem utilizadas no estudo foram *Ceriodaphnia rigaudi*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Moina micrura.*

Moina micrura Kurz, 1874 (Fig 1) é um cladócero com tamanho entre 0,5 e 1,2 mm, que possui características marcantes descritas por Elmoor-Loureiro (1997) como a depressão supraocular bem desenvolvida, olho grande, pós-abdômen curto e estreito e garra sem pécten forte. Sua distribuição mundial é ampla, tendo a ocorrência registrada no Brasil, Uganda, México, Rússia, Austrália, Espanha, Nigéria, República Tcheca, Japão e Colômbia (GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY, 2023a) (Fig 2).

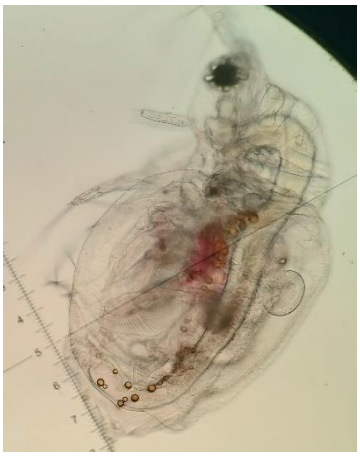


Figura 1. Vista geral de *Moina micrura.* Foto da autora: Raymundo, 2023.

Figura 2. Mapa de ocorrência e distribuição de *Moina micrura*. Pontos laranjas indicam áreas de maior ocorrência. Disponível na plataforma GBIF (2023).

Ceriodaphnia rigaudi Sars, 1886 (Fig 3) é um cladócero com tamanho entre 0,4 e 0,6 mm, possui entre outras características mencionadas por Elmoor-Loureiro (1997), a forma oval, cabeça curvada e garras lisas ou pectinadas. Sua ocorrência foi registrada no Brasil, México, Guatemala, África do Sul, República Democrática do Congo, Nicaragua e Estados Unidos (GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY, 2023b) (Fig 4).

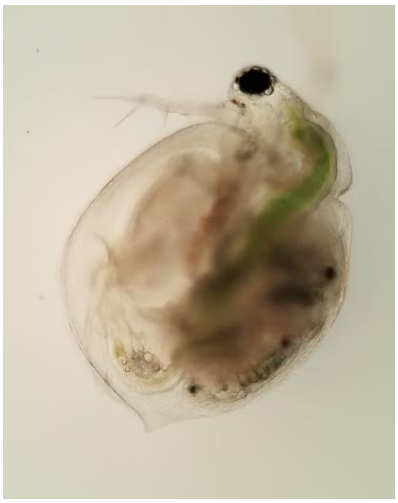


Figura 3. Vista geral de *Ceriodaphnia rigaudi*. Foto da autora: Raymundo, 2023.

Figura 4. Mapa de ocorrência e distribuição de *Ceriodaphnia rigaudi*. Pontos em cor laranja indicam áreas de maior ocorrência. Disponível na plataforma GBIF (2023).

Ceriodaphnia silvestrii Daday, 1902 (Fig 5) é um cladócero de tamanho entre 0,66 e 0,88 mm, descrita por Elmoor-Loureiro (1997) como de forma arredondada, com cabeça anteriormente globosa e olho grande que preenche quase toda a porção anterior da cabeça. Sua ocorrência foi registrada no Brasil e nas Ilhas Falkland (Malvinas) (GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY, 2023c) (Fig 6).

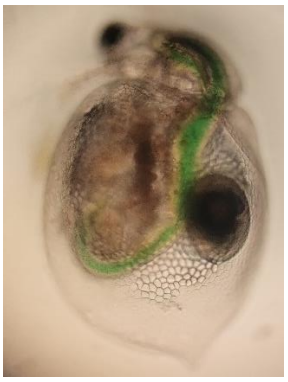


Figura 5. Vista geral de *Ceriodaphnia silvestrii*. Foto da autora: Raymundo, 2023.

Figura 6. Mapa de ocorrência e distribuição de *Ceriodaphnia silvestrii*. Pontos em cor laranja indicam áreas de maior ocorrência. Disponível na plataforma GBIF (2023).

1.7 Avaliação de Risco Ecológico

A avaliação de risco busca avaliar a probabilidade de ocorrer um efeito adverso previsto devido a exposição ambiental a um ou mais agentes estressores (USEPA, 1998).

A avaliação de risco é feita em fases, conforme descrito por USEPA (1998): A fase inicial é a formulação do problema, na qual articula- se o propósito da avaliação, define-se o problema e estabelece-se um plano de análise e caracterização de risco. A integração de informações sobre fontes, estressores, efeitos e características do ecossistema e do receptor resulta na geração de dois produtos: *endpoints* de avaliação e modelos conceituais. Na fase subsequente, denominada análise, os dados são avaliados para determinar a probabilidade de exposição aos estressores (caracterização da exposição) e, dado esse cenário, identificar o potencial e tipo de efeitos ecológicos esperados (caracterização dos

efeitos ecológicos). A análise inicia-se com a avaliação dos pontos fortes e limitações dos dados sobre exposição, efeitos e características do ecossistema e receptor, sendo posteriormente conduzida para caracterizar a exposição e as respostas ecológicas nas circunstâncias delineadas nos modelos conceituais (USEPA, 1998).

Nos Estados Unidos, a avaliação de risco tem sido utilizada para respaldar medidas regulatórias, tais como o registro de pesticidas, o estabelecimento de padrões de qualidade do ar e da água, e a remediação de áreas de disposição de resíduos perigosos, entre outras ações (RODRIGUES et al., 2011). Embora seja comum e bem estabelecida em países da América do Norte (Estados Unidos e Canadá) e Europa (como o Reino Unido, Alemanha e Holanda), sua utilização é rara em países sul-americanos, onde o trabalho de base em Ecotoxicologia ainda está em estágio inicial, apesar de esforços recentes, principalmente na avaliação dos efeitos de agroquímicos (NIEMEYER et al., 2007).

2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar os efeitos dos compostos clorpirifós (inseticida) e cloreto de cádmio (metal), isolados e em combinação, sobre cladóceros nativos de regiões neotropicais, além de fazer avaliação de risco desses compostos para corpos d’água brasileiros.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a sensibilidade das populações das espécies cultivadas com as faixas de sensibilidade a compostos de referência disponíveis na literatura ou determinar a faixa de sensibilidade para aquelas que eventualmente não possuam. Para isso, foram determinadas a CE_{50}-48h

ao composto de referência (NaCl) com o intuito de permitir a avaliação da saúde dos organismos, anteriormente à realização dos testes de toxicidade com o pesticida e com o metal selecionados;

- Determinar e comparar a sensibilidade das espécies aos compostos Clorpirifós e Cloreto de Cádmio por meio de efeitos letais (testes de toxicidade aguda, com duração de 48 horas) de forma isolada e em mistura;

- Determinar a sensibilidade das espécies aos compostos Clorpirifós e Cloreto de Cádmio por meio de efeitos subletais (testes crônicos, com duração de 7 dias), de forma isolada;

- Avaliar a toxicidade dos compostos presentes na água, no alimento (alga) e em ambos;

- Determinar as concentrações reais de Clorpirifós e Cádmio nos testes de toxicidade por meio de análises químicas cromatográficas e espectrofotométricas;

- Fazer uma avaliação de risco preliminar do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio para corpos d'água brasileiros.

2.3. Hipóteses

- O agrotóxico Clorpirifós é mais tóxico do que o Cádmio aos cladóceros (organismos não alvo), por permanecer mais tempo na coluna d'água;
- As espécies apresentam efeitos subletais quando expostas a menores concentrações dos compostos por mais tempo (testes crônicos);
- A toxicidade dos compostos em mistura será maior do que dos compostos isolados (sinergismo);

- A toxicidade de ambos compostos será maior quando a via de exposição for dupla, simultaneamente dissolvidos na água e incorporados no alimento;
- Tanto o agrotóxico Clorpirifós quanto o metal Cádmio representam potenciais riscos ecológicos para os corpos d'água brasileiros.

Referências

ADAMS, S. M.; GREELEY, M. S. Ecotoxicological Indicators of Water Quality: Using Multi-response Indicators to Assess the Health of Aquatic Ecosystems. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 123, n. 1/4, p. 103–115, 2000.

ALI, M. M. et al. Assessment of Trace Elements in the Demersal Fishes of a Coastal River in Bangladesh: a Public Health Concern. **Thalassas: An International Journal of Marine Sciences**, v. 36, n. 2, p. 641–655, 30 out. 2020.

ANVISA, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Monografia C-20**. https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4226json-file-1/view, 2021.

ANVISA, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Documento preparatório - reavaliação Clorpirifós**. https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/reavaliacao-de-agrotoxicos-2/MotivosClorpirifos.pdf, 2022.

AOSHIMA, K. Current status and future of itai-itai disease. **Journal of Nippon Hygiene**, v. 67, n. 4, p. 455–463, 2012.

ARAGÃO, M. A.; ARAUJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. Em: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2014. p. 117–152.

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera**). 2016.

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373: **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera).** 2017.

BABY, J. et al. Toxic effect of heavy metals on aquatic environment. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 4, n. 4, 7 jan. 2011.

BANAAE, M.; TAHERI, S.; HEDAYATZADEH, F. Effects of Cadmium and Dimethoate on Some Biological and Biochemical Indices in Freshwater Green Algae, *Spirogyra* sp. **Pollution**, v. 4, n. 4, p. 593–603, 2018.

BLISS, C. I. THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY1. **Annals of Applied Biology**, v. 26, n. 3, p. 585–615, ago. 1939.

BOUDH, S.; SINGH, J. S. Pesticide Contamination: Environmental Problems and Remediation Strategies. Em: Emerging and Eco-Friendly **Approaches for Waste Management**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 245–269.

BRASIL, Ministério Da Saúde. **Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano**. http://ads.saude.gov.br/servlet/mstrWeb?src=mstrWeb.3140&evt=3140&hiddensections=header%2Cpath%2CdockTop%2CdockLeft%2Cfooter&currentViewMedia=1&visMode=0&documentID=C3C0CEC211EBD4A500000080EFD5565B&Server=SRVBIPDF03&Port=0&Project=DMSISAGUA&, 2023.

CASTILHOS, Z. et al. Caracterização das águas superficiais e teores de mercúrio em sedimentos e em peixes. Em: **Ecorregiões Aquáticas Xingu-Tapajós**. CETEM, 2012. p. 103–138.

CHEN, L. et al. Characterization of the Interaction between Cadmium and Chlorpyrifos with Integrative Techniques in Incurring Synergistic Hepatoxicity**. PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59553, 14 mar. 2013.

CONAMA, Conselho Nacional Do Meio Ambiente. **Resolução no 357, 17 de março de 2005**. https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdfMinistério Do Meio Ambiente, 2005.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COSTA, L. A. DA. **Análise das concentrações de metais pesados na água e sedimento do Rio Sergipe (SE).** Monografia —São Cristovão: Universidade Federal de Sergipe, 2018.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. Em: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia Aquática-princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2014. p. 153–184.

DUTRA, R. M. S.; SOUZA, M. M. O. DE. Cerrado, Revolução Verde e a Evolução no Consumo de Agrotóxicos. **Sociedade & Natureza**, v. 29, n. 3, p. 469–484, 20 dez. 2017.

ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. **Manual de identificações de cladóceros límnicos do Brasil**. Brasília: Universa, 1997.

EL-NAHHAL, I.; EL-NAHHAL, Y. Pesticide residues in drinking water, their potential risk to human health and removal options. **Journal of Environmental Management**, v. 299, p. 113611, dez. 2021.

ERIE, J. C. et al. Heavy Metal Concentrations in Human Eyes. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 5, p. 888–893, maio 2005.

FARAG, A.; EL OKAZY, A. M.; EL-ASWED, A. F. Developmental toxicity study of chlorpyrifos in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 2, p. 203–208, abr. 2003.

FOLT, C. L. et al. Synergism and antagonism among multiple stressors**. Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 3part2, p. 864–877, maio 1999.

FOONG, S. Y. et al. A recent global review of hazardous chlorpyrifos pesticide in fruit and vegetables: Prevalence, remediation and actions needed. **Journal of Hazardous Materials**, v. 400, p. 123006, dez. 2020.

FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute Toxicity Tests with the Tropical Cladoceran Pseudosida ramosa: The Importance of Using Native Species as Test Organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 241–249, 13 fev. 2011.

GALHARDI, J. A.; BONOTTO, D. M. Hydrogeochemical features of surface water and groundwater contaminated with acid mine drainage (AMD) in coal mining areas: a case study in southern Brazil**. Environmental Science and Pollution Research,** v. 23, n. 18, p. 18911–18927, 22 set. 2016.

GAUTAM, R. K. et al. Contamination of Heavy Metals in Aquatic Media: Transport, Toxicity and Technologies for Remediation. Em**: Heavy Metals In Water**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2014. p. 1–24.

GEFFARD, O. et al. Effects Of Chronic Dietary And Waterborne Cadmium Exposures On The Contamination Level And Reproduction Of Daphnia Magna. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 1128, 2008.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. **Moina micrura Kurz, 1875**.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. **Ceriodaphnia rigaudi Richard, 1894**.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. **Ceriodaphnia silvestrii Daday, 1902**.

GOMES, L. C. et al. Genotoxicity effects on Geophagus brasiliensis fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil**. Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 4, p. 659–664, nov. 2019.

GUIMARÃES-SILVA, A. K. et al. A qualidade das águas na região dos garimpos de topázio imperial na sub-bacia do rio da Ponte, Ouro Preto-MG. Rem: **Revista Escola de Minas**, v. 60, n. 4, p. 603–611, dez. 2007.

HANAZATO, T. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. **Environmental Pollution**, v. 112, n. 1, p. 1–10, 2001.

HASHEMI, M. Heavy metal concentrations in bovine tissues (muscle, liver and kidney) and their relationship with heavy metal contents in consumed feed. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 154, p. 263–267, jun. 2018.

HAYAT, K. et al. Determination of pesticide residues in blood samples of villagers involved in pesticide application at District Vehari (Punjab), Pakistan. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, n. 10, p. 666–683, 2010.

KRULL, M.; BARROS, F. Key issues in aquatic ecotoxicology in Brazil: a critical review. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 2, 2012.

KUMAR, R. et al. Impact of Pesticide Toxicity in Aquatic Environment**. Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 10131–10140, 12 out. 2020.

LAMEIRA, V. **Estudos dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do farmáco triclosan para Daphnia similis, Ceriodaphnia dubia, Ceriodaphnia silvestrii (Cladocera, crustacea)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 3 jul. 2008.

LARA, W. H.; BATISTA, G. C. Pesticidas. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 161–166, 1992.

LIMA, D. P. et al. Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 4, p. 405–414, dez. 2015.

LOUREIRO, S. et al. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: Comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. **Environmental Toxicology and Chemistry,** v. 29, n. 8, p. 1716–1726, ago. 2010.

MAHMOOD, I. et al. Effects of Pesticides on Environment. Em: Plant, Soil and Microbes. Cham: **Springer International Publishing**, 2016. p. 253–269.

MAHURPAWAR, M. Effects of hevy metals on human health. **International Journal of Research**, v. 530, p. 1–7, 2015.

MANSANO, A. S. et al. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 312–321, ago. 2017.

MANSANO, A. S. et al. Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 13335–13346, 21 maio 2018.

MARTINS, S. E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 7, p. 1866, 2011.

MIGUEL, M. **Efeito do hormônio sintético 17-etinilestradiol e do herbicida atrazina em espécies de dois níveis tróficos**. Tese (Doutorado em Ciência) —São Carlos: Universidade de São Paulo, 13 abr. 2020.

MOHAMMED, A. Why are Early Life Stages of Aquatic Organisms more Sensitive to Toxicants than Adults? Em: **New Insights into Toxicity and Drug Testing.** InTech, 2013.

MOREIRA, R. A. et al. Exposure to environmental concentrations of fipronil and 2,4-D mixtures causes physiological, morphological and biochemical changes in *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111180, dez. 2020.

MORRO, F.; SCHNITZLER, D. Avaliação de agrotóxicos em solo de sistemas de produção agrícola convencional e agroecológico. **Química Nova**, 2021.

MUSTAFA, A. et al. Susceptibility of wolf spider, Lycosa terrestris (Araneae: Lycosidae) to chlorpyrifos. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 43, n. 2, p. 403–405, 2011.

NI, W. et al. Umbilical Cord Concentrations of Selected Heavy Metals and Risk for Orofacial Clefts. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 18, p. 10787–10795, 18 set. 2018.

NIEMEYER, J. C.; DA SILVA, E. M.; SOUSA, J. P. Desenvolvimento de um Esquema para Avaliação de Risco Ecológico em Ambientes Tropicais: Estudo de Caso da Contaminação por Metais em Santo Amaro da Purificação, Bahia, Brasil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p. 263–267, 2007.

OLIVEIRA, H. S. P.; FRANÇA, S. C. A.; ROCHA, E. J. P. Atividades de mineração e avaliação de metais em água superficial, sedimento de fundo e peixes no Rio Tapajós. Em: **Amazônia em tempo: estudos climáticos e socioambientais.** Belém: Embrapa, 2015. p. 195–222.

PADMANABAN, A. M.; MOHAN, K. A study on Behavioral responses to sub lethal and lethal concentrations of cadmium chloride (cdcl2. H2O) in freshwater crab *Paratelphusa hydrodromous* (Decapoda: Brachyura). **Zoology**, v. 2, n. 8, p. 522–528, 2013.

PATETSINI, E.; DIMITRIADIS, V. K.; KALOYIANNI, M. Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 338–345, jan. 2013.

PAVLAKI, M. D. et al. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna.* **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 99–110, jan. 2011.

PEREIRA, J. G. **Levantamento dos níveis de metais pesados em águas brasileiras - uma visão toxicológica**. Monografia (Bacharel em Farmácia)—Ouro Preto : Universidade Federal de Ouro Preto, 2021.

PÉREZ, J. et al. Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1167–1175, 30 ago. 2011.

POURRET, O.; BOLLINGER, J.-C.; HURSTHOUSE, A. Heavy metal: a misused term? **Acta Geochimica**, v. 40, n. 3, p. 466–471, 25 jun. 2021.

QIU, Y.-W. Bioaccumulation of heavy metals both in wild and mariculture food chains in Daya Bay, South China. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 163, p. 7–14, set. 2015.

RIBEIRO, E. V. et al. **Metais Pesados e Qualidade da Água do Rio Sao Francisco no Seguimento entre Três Marias e Pirapora - MG: Índice de contaminação**. Geonomos, 31 jul. 2012.

RODRIGUES, A. P. C. et al. **Avaliação de risco ecológico: conceitos básicos, metodologia e estudo de caso**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2011.

SANT'ANA, L. S.; VASSILIEFF, I.; JOKL, L. Levels of organochlorine insecticides in milk of mothers from urban and rural areas of botucatu, SP, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,** v. 42, n. 6, p. 911–918, jun. 1989.

SELVI, M.; GÜL, A.; YILMAZ, M. Investigation of acute toxicity of cadmium chloride (CdCl2·H2O) metal salt and behavioral changes it causes on water frog (Rana ridibunda Pallas, 1771). **Chemosphere**, v. 52, n. 1, p. 259–263, jul. 2003.

SOBHA, K. et al. A Study on Biochemical Changes in the Fresh Water Fish, <i>Catla catla</i> (Hamilton) Exposed to the Heavy Metal Toxicant Cadmium Chloride**. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 3, n. 2, p. 1–11, 1 jan. 1970.

SOFYAN, A.; SHAW, J. R.; BIRGE, W. J. Metal trophic transfer from algae to cladocerans and the relative importance of dietary metal exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 1034, 2006.

SONONE, S. S. et al. Water Contamination by Heavy Metals and their Toxic Effect on Aquaculture and Human Health through Food Chain. **Letters in Applied NanoBioScience**, v. 10, n. 2, p. 2148–2166, 21 out. 2020.

SOTOMAYOR, V. et al. Developmental and polyamine metabolism alterations in Rhinella arenarum embryos exposed to the organophosphate chlorpyrifos. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 9, p. 2052–2058, set. 2012.

STARA, A.; KOUBA, A.; VELISEK, J. Biochemical and histological effects of sub-chronic exposure to atrazine in crayfish Cherax destructor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 291, p. 95–102, ago. 2018.

TADEO, J. L.; SANCHEZ-BRUNETE, C.; GONNZALEZ, L. Pesticides: classification and properties. Em: TADEO, J. L. (Ed.). **Analysis of pesticides in food and environmental samples**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2008. p. 1–34.

TATO, T.; BEIRAS, R. The Use of the Marine Microalga Tisochrysis lutea (T-iso) in Standard Toxicity Tests; Comparative Sensitivity With Other Test Species. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, 8 ago. 2019.

TESTAI, E.; BURATTI, F. M.; DI CONSIGLIO, E. Chlorpyrifos. Em: **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology.** Elsevier, 2010. p. 1505–1526.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Recursos Hídricos no Século XXI.** 1. ed. São Paulo: Oficina de textos, 2011.

U.S. EPA. **EPA Takes Action to Address Risk from Chlorpyrifos and Protect Children's Health**. USEPA, U. S. E. P. A. Guidelines for Ecological Risk Assessment. Washington, DC: [s.n.].

WALLACE, D. R.; BUHA DJORDJEVIC, A. Heavy metal and pesticide exposure: A mixture of potential toxicity and carcinogenicity. **Current Opinion in Toxicology**, v. 19, p. 72–79, fev. 2020.

WANG, N. et al. Accumulation levels and characteristics of some pesticides in human adipose tissue samples from Southeast China. **Chemosphere**, v. 84, n. 7, p. 964–971, ago. 2011.

WILDING, J.; MALTBY, L. Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: implications for risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 1795, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cadmium: environmental aspects**. https://apps.who.int/iris/handle/10665/39366, 1992.

XU, M.-Y. et al. Metabolomic analysis for combined hepatotoxicity of chlorpyrifos and cadmium in rats. **Toxicology**, v. 384, p. 50–58, jun. 2017.

YADALA, R. et al. Cadmium (Cd) and Chlorpyrifos (CPF) Induced Pulmonary Toxicity in Wistar Rats. **Journal of Animal Research**, v. 10, n. 3, 25 jun. 2020.

YILMAZ, M.; GÜL, A.; KARAKÖSE, E. Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride (CdCl2·H2O) metal salt on behavior of the guppy (Poecilia reticulata). **Chemosphere**, v. 56, n. 4, p. 375–380, jul. 2004.

YU, Y. et al. Joint toxic effects of cadmium and four pesticides on the earthworm (Eisenia fetida). **Chemosphere**, v. 227, p. 489–495, jul. 2019.

ZAGATTO, P. A. O uso de substâncias de referência no controle de qualidade de ensaios ecotoxicológicos. Em: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2014. p. 185–197.

ZHAO, Q.; DOURSON, M.; GADAGBUI, B. A review of the reference dose for chlorpyrifos. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 111–124, mar. 2006.

CAPÍTULO 2 - Efeitos da toxicidade aguda do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio, tanto isolados como em misturas, sobre duas espécies de cladóceros nativos neotropicais

RESUMO

A utilização excessiva de agrotóxicos na agricultura e a elevada utilização de metais em atividades industriais ou aplicações tecnológicas têm aumentado notavelmente as concentrações destes poluentes tanto nos ecossistemas aquáticos como terrestres, no mundo todo, tornando a biota aquática cada vez mais vulnerável e sob risco de extinção de muitas espécies. A maior parte dos habitats aquáticos recebe poluentes oriundos de diversas ações antrópicas, podendo ocorrer interações entre os compostos tornando-os ainda mais tóxicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos compostos Clorpirifós (inseticida) e Cádmio (metal), isolados e em misturas, sobre os cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Para isso, foram realizados testes de toxicidade aguda dos compostos de forma isolada e em mistura e realizada uma avaliação de risco ecológico (ARE) para ambos os compostos. Os testes de toxicidade aguda com o Cádmio resultaram em CE50-48h de 0,02 mg L^{-1} para *C. rigaudi* e de 0,026 mg L^{-1} para *C. silvestrii*, enquanto os testes com Clorpirifós resultaram em CE50-48h de 0,047 µg L^{-1} e 0,062 µg L^{-1} respectivamente. O teste em mistura para *C. rigaudi* evidenciou a ocorrência de efeitos aditivos, enquanto para *C. silvestrii* ocorreram efeitos antagônicos dependendo do nível da dose. Através da Avaliação de Risco Ecológico evidenciou-se que o Cádmio representou alto risco, enquanto o Clorpirifós representou risco insignificante a alto.

Palavras-chave: Ecotoxicidade; Misturas tóxicas; Cladóceros; Toxicidade aguda; Avaliação de risco ecológico.

1. Introdução

Os ecossistemas aquáticos apresentam alta vulnerabilidade devido à presença de diversos compostos. Um exemplo são os agrotóxicos que adentram esses ambientes a partir de diversas fontes, como resíduos provenientes de atividades agrícolas, causados pela deriva de agrotóxicos, escoamento superficial (dissolvido na água ou adsorvido em partículas), lixiviação no solo e contaminação da água subterrânea (EL-NAHHAL; EL-NAHHAL, 2021).

Apesar de banido em diversos países da União Europeia e nos Estados Unidos (VILLAR; SCHAEFFER, 2022a), o clorpirifós é um dos inseticidas mais utilizados no mundo (SOLOMON et al., 2014). Nos Estados Unidos as estimativas anuais de uso variavam entre 3,2 a 4,1 M kg (SOLOMON et al., 2014), no México o uso entre 2010 e 2020 foi de 114751,77 toneladas (RUIZ-ARIAS et al., 2023), no Iran entre 2012 e 2014 o uso foi de 1134 toneladas (MORTEZA et al., 2017), na China o uso anual é de cerca de 18000 toneladas (LIU et al., 2014) e no Brasil, em 2022 o clorpirifós foi o 9º ingrediente ativo mais comercializado, com 17679,34 toneladas vendidas (IBAMA, 2022a). Foram relatados valores medidos em rios brasileiros que variaram de 0,003 µg L^{-1} na bacia do Pantanal (LAABS et al., 2002) a 0,36 µg L^{-1} no Ribeirão Preto (CETESB, 2021).

No Brasil, o clorpirifós é utilizado nas culturas de algodão, amendoim, aveia, batata, café, centeio, cevada, citros, ervilha, feijão, grão-de-bico, lentilha, maçã, milho, pastagem, soja, sorgo, trigo, tomate e batata, além de usos no controle de formigas e como preservante de madeiras (ANVISA, 2021). Seu modo de ação é através da inibição da enzima colinesterase nos sistemas nervoso central e periférico, resultando em um acúmulo de acetilcolina que promove a neurotoxicidade em animais (ZHAO et al., 2006).

Além dos agrotóxicos há uma variedade de poluentes presentes nos ecossistemas aquáticos, como os metais potencialmente tóxicos. Oriundos de resíduos de mineração, lixiviação de aterros sanitários, escoamento urbano e resíduos industriais (GAUTAM et al., 2014), esses metais não podem ser biodegradados e a bioacumulação os torna bastante perigosos (BABY et al., 2011).

O cádmio é um metal bastante preocupante pois, ao contrário de outros como cobre e zinco, o cádmio não é essencial para os sistemas biológicos e mesmo em baixas concentrações pode ser altamente tóxico (GAUTAM et al., 2014). Ele é naturalmente liberado no ambiente por processos como intemperismo e erupções vulcânicas, porém há um aumento rápido e constante devido a atividades humanas como mineração e atividades industriais como galvanoplastia, fabricação de tintas, corantes e baterias (SOBHA et al., 1970). Segundo a resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005), o valor máximo de cádmio nas águas doces é de 0,001 mg L^{-1}. Porém, valores máximos medidos em rios brasileiros são superiores, como para o Rio São Francisco com 0,02 mg L^{-1} (RIBEIRO et al., 2012), para Rio Tapajós com 0,004 mg L^{-1} (OLIVEIRA; FRANÇA; ROCHA, 2015) e para Rio Cassiporé com 0,8 mg L^{-1} (LIMA et al., 2015a), ambos pertencentes à bacia do rio Amazonas.

Na natureza, os poluentes não estão presentes de forma isolada, portanto é necessário avaliar suas possíveis interações. Apesar de serem comuns e coexistirem no meio ambiente, a toxicidade combinada do cádmio e do clorpirifós ainda não foi completamente elucidada (WANG et al., 2017). Com intuito de explicar o comportamento de compostos em mistura, foram desenvolvidos modelos teóricos baseados em dois conceitos de referência que preveem a toxicidade da mistura com base nas toxicidades individuais dos componentes na mesma, assumindo que não há interação entre os compostos (MANSANO et al., 2017; MIGUEL, 2020). São o modelo da adição da concentração e da ação independente (BLISS, 1939; PÉREZ et al., 2011b), podendo ainda haver os desvios sinergismo ou antagonismo, dependentes do nível da dose (*Dose level* - DL) ou da proporção da dose (*Dose ratio* – DR) (MANSANO et al., 2017).

Avaliações de toxicidade direcionadas aos efeitos causados pelos produtos de forma individual e em mistura aliados a avaliação de risco podem ser adequadas para investigar os efeitos desses estressores à biota. A avaliação de risco ecológico (ARE) é uma ferramenta que permite analisar a probabilidade de ocorrência de efeitos adversos no ambiente decorrentes da exposição a determinados agentes (EPA, 1998). Como forma de aumentar a representatividade nas pesquisas brasileiras, o uso de espécies nativas como

organismos-teste vem sendo recomendado (MARTINS; BIANCHINI, 2011). Além disso, promove uma avaliação mais realista sobre sua sensibilidade, facilita a logística e evita a introdução de espécies exóticas (FREITAS; ROCHA, 2011; MANSANO et al., 2018).

2. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram: (I) avaliar os efeitos de toxicidade aguda (imobilidade) dos compostos clorpirifós e cádmio, isoladas e em misturas (combinações), sobre os cladóceros nativos *Ceriodaphnia rigaudi* e *Ceriodaphnia silvestrii*, verificando se ocorrem ou não interações entre os compostos; (II) avaliar a sensibilidade das espécies nativas comparando-as com outros organismos-teste bastante utilizados; e (III) realizar estimativas de risco ecológico baseadas em quocientes de risco (RQs) para ambos os compostos.

3. Metodologia

3.1 Cultivo e manutenção dos organismos-teste

Indivíduos das espécies *Ceriodaphnia rigaudi,* Richard, 1894 (Crustacea, Cladocera, Daphnidae) e *Ceriodaphnia silvestrii,* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera, Daphnidae) foram coletados na Represa do Broa, localizada entre os municípios de Itirapina - SP e Brotas - SP. Após a coleta foram aclimatadas e mantidas conforme os procedimentos descritos pelo protocolo 13373 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2017), em béqueres de 2 L contendo água reconstituída composta de 1,5 g L^{-1} $CaSO_4.2H_20$, 6,1 g L^{-1} $MgSO_4.7H_2O$, 4,8 g L^{-1} $NaHCO_3$ e 0,2 g L^{-1} KCl dissolvidos em água destilada, com dureza total entre 40 e 48 mg $CaCO_3$ L^{-1}, pH entre 7 e 7,6 e condutividade em torno de 160 µS cm^{-1}. Além disso, foi adicionada 1 gota de vitamina Potemin® por litro de água reconstituída.

A renovação do meio de cultivo foi realizada três vezes por semana, sendo duas completas e uma parcial. Os béqueres foram cobertos com filme plástico e mantidos em temperatura de 25 ± 1° C e fotoperíodo de 12:12 horas claro/escuro.

A alimentação consistiu de uma suspensão algal da microclorofícea *Raphidocelis subcapitata* cultivada em meio CHU-12 na concentração de 10^5 células por litro e 1 mL L^{-1} de um aditivo alimentar composto de partes iguais de ração fermentada de peixe (TetraMin®) e leveduras (fermento biológico seco tipo Fleischmann® e água destilada).

3.2 Compostos químicos utilizados

Os compostos utilizados nesse estudo foram o Cloreto de Cádmio Monohidratado puríssimo ($CdCl_2.H_2O$, CAS: 7790-78-5) da marca Vetec (grau de pureza 99%), e o Clorpirifós ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, CAS: 2921-88-2) da marca Sigma Aldrich (grau de pureza 98%).

Para o teste com o Cádmio isolado, foi preparada uma solução estoque na concentração 10 mg L^{-1}. A partir dessa solução, para *C. rigaudi* foram preparadas cinco concentrações por meio de diluições em série em água reconstituída (0,02; 0,03; 0,04; 0,05 e 0,06 mg L^{-1}), além do controle. Para *C. silvestrii* as concentrações, também preparadas a partir da solução de 10 mg L^{-1}, foram de 0,04; 0,05; 0,06; 0,07 e 0,08 mg L^{-1}, além do controle.

A quantificação do cádmio foi feita de acordo com as diretrizes da 23ª edição do Standard Methods (SMWW, 3111 B). Uma alíquota da solução estoque foi retirada, acidificada com ácido nítrico concentrado até atingir pH < 2,0 e empregada para a determinação das concentrações reais. Essas análises foram conduzidas utilizando um Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES Optima 8300/Perkin Elmer).

Para o teste com Clorpirifós isolado, foi preparada uma solução-estoque na concentração 1 mg L^{-1}. A partir dessa solução foram preparadas cinco concentrações por meio de diluições em série em água reconstituída (0,01; 0,02; 0,04; 0,08 e 0,16 µg L^{-1}), além do controle e o controle com o solvente (acetonitrila) na maior concentração testada (3,2 e-6 µg L^{-1}). Para *C. silvestrii,* as concentrações, também preparadas a partir da solução de 1 mg L^{-1}, foram de 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 e 0,16 µg L^{-1}, além do controle e o controle com o solvente.

A quantificação do Clorpirifós foi feita via cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector UV (HPLC-UV). Uma alíquota da solução estoque foi retirada e mantida em refrigeração até o momento da análise. A análise foi conduzida utilizando o equipamento HPLC Agilent 1260 Infinity II, acoplado ao detector UV-Vis, operando em 210 nm e utilizando uma coluna Phenomenex Kinetex (5µ, EVO C18, 100Ä, 150 x 4,6 mm). A fase móvel utilizada foi Água (A)/Acetonitrila (B) no modo isocrático a 30%A / 70%B, com vazão de fase móvel de 0,8 mL min^{-1}, volume de injeção de 10 µL e temperatura da coluna 40ºC. Após a quantificação, as concentrações nominais foram ajustadas para que representassem o valor real do composto.

Para os testes de toxicidade aguda das misturas foi utilizado o desenho experimental de combinação fatorial completa, que inclui um teste para cada composto e vinte e cinco combinações de ambos, com quatro réplicas para cada tratamento (Apêndice A).

3.3 Testes de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda seguiram metodologias adaptadas dos padrões da Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT NBR 12713 (ABNT, 2016), ABNT NBR 13373 (ABNT, 2017) e Method 1002.0 (EPA, 2002). Os testes foram estáticos (sem renovação do meio) com duração de 48 horas.

Os organismos de 6h a 24h de idade foram dispostos em recipientes plásticos contendo 15 mL de solução-teste ou água reconstituída (controle) e 5 organismos por réplica. Para cada concentração foram realizadas 4 réplicas. Os recipientes foram mantidos sem aeração, sem alimentação e sem iluminação, em incubadora com temperatura controlada de 25 ± 1º C. As variáveis pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido foram medidas no início e ao final de cada experimento. A dureza foi medida somente no início. Os indivíduos foram observados ao final de 48 horas, obtendo-se assim o número de indivíduos imóveis para o cálculo da concentração que causa efeito a 50% dos organismos em relação ao controle (CE50-48h).

3.4 Análise de dados

Os valores de CE50-48h e respectivos intervalos de confiança de 95% para os testes de toxicidade aguda foram calculados por regressão não linear, ajustando-se uma equação logística aos dados no software Statistica 12.5 (STATSOFT, 2014).

Os dados dos testes em mistura foram analisados pelos modelos de adição da concentração (CA) e ação independente (IA). Primeiramente, os dados observados foram comparados com o efeito esperado para a mistura, calculado com base nas exposições individuais através da ferramenta MIXTOX. Posteriormente foram realizadas análises estendidas considerando três tipos de desvios dos modelos de referência: interações sinérgicas/antagônicas (S/A), desvio dependente da proporção da dose (DR) e desvio dependente do nível da dose (DL). Esses desvios foram modelados adicionando dois parâmetros ("a" e "b"). O parâmetro "a" assume valores negativos ou positivos, caso haja desvio sinérgico ou antagônico. Para o desvio dependente da proporção da dose (DR), um segundo parâmetro "bDR" foi incluído, permitindo identificar o papel de cada composto na mistura. Para o desvio dependente do nível da dose (DL), outro parâmetro "bDL" foi incluído, indicando em qual nível de dose ocorre a mudança no desvio. O valor de "a" indica o desvio em baixas e altas doses, enquanto o valor de "bDL" indica o nível de dose em que o desvio ocorre. Os dados foram ajustados aos modelos conceituais e aos desvios, utilizando o método de máxima verossimilhança para selecionar o melhor ajuste. Uma vez identificado o modelo mais adequado estatisticamente para descrever o desvio, o padrão de efeitos foi deduzido diretamente a partir dos valores dos parâmetros, e o desvio máximo pode ser calculado em termos de nível de efeito (JONKER et al., 2005; MANSANO et al., 2020) .

3.5 Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD)

Os valores médios de CE50 obtidos nesse estudo foram comparados com valores de CE50 ou CL50 para outros grupos utilizando a abordagem de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD). Os dados foram obtidos através do banco de dados ECOTOX da Agência de Proteção Ambiental dos

Estados Unidos (US-EPA), sendo selecionados artigos com dados de CE50 ou CL50, para crustáceos, rotíferos, anfíbios epeixes expostos em água doce e com análises químicas medidas. Quando havia mais de um dado para o mesmo organismo, foram calculadas médias geométricas. Todas as referências utilizadas são apresentadas no material suplementar (Apêndice B).

Foram construídas curvas de distribuição log - normal utilizando-se o software R com o pacote SSDtools versão 1.0.2 (THORLEY; SCHWARZ, 2018) e o software ETX 2.0 para calcular os valores de HC5 (concentração perigosa para 5% das espécies) e HC50 (concentração perigosa para 50% das espécies) juntamente com seus limites de confiança de 95% conforme Aldenberg & Jaworska (2000). A premissa subjacente ao software é a distribuição log-normal dos dados, e a verificação da normalidade logarítmica foi realizada por meio do teste de Anderson-Darling, disponível no pacote de software ETX, com um nível de significância de 5%.

3.6 Avaliação de risco ecológico

A avaliação de risco ecológico foi feita derivando quocientes de risco (RQ), calculados a partir da razão entre as concentrações ambientais medidas (MEC) e a concentração sem efeito previsto (PNEC) (SÁNCHEZ-BAYO; BASKARAN; KENNEDY, 2002). Valores de PNEC foram obtidos por meio da divisão do valor de HC5 resultante da curva SSD por um fator de avaliação (AF = 4), que foi selecionado devido ao grau de incerteza associado ao número de informações ecotoxicológicas de diversos grupos taxonômicos disponíveis para elaboração de curvas SSD (GOMES et al., 2023; MOREIRA et al., 2020). Os valores de RQ para o Cádmio foram avaliados conforme a escala: Risco Baixo (RQ < 0,1), Risco Médio (RQ variando de 0,1–1) e Risco Alto (RQ > 1) (GOMES et al., 2023; YAN et al., 2022). Enquanto para o Clorpirifós, seguiram a escala: Insignificante (RQ < 0,01), Risco Baixo (0,01 < QR < 0,1), Risco Médio (0,1 < QR < 1), Risco Alto (RQ=1) e Risco Muito Alto (RQ > 1) (MOREIRA et al., 2020, SÁNCHEZ-BAYO et al., 2002).

Valores de MEC foram obtidos por meio de dados disponíveis no *Web of Science, Scopus, Science Direct* e bancos de teses e dissertações de universidades brasileiras, sendo selecionados artigos com o método de

quantificação descrito e para corpos hídricos brasileiros, que podem ser consultados nas tabelas no material suplementar (Apêndice C).

4. Resultados

4.1 Quantificação das substâncias

A concentração de cádmio quantificada na solução estoque pode ser consultada na tabela no material suplementar (Apêndice D). A concentração do metal se manteve dentro da variação de 10% em relação à concentração desejada, conforme preconizado pela norma ISO 10706:2000 (ISO, 2000). Essa consistência reforça a segurança na utilização das concentrações nominais.

A concentração de clorpirifós quantificada na solução estoque pode ser consultada na tabela no material suplementar (Apêndice E).

4.2 Testes de toxicidade aguda

Durante os testes, os parâmetros físicos e químicos foram monitorados e variaram entre pH (7,19 a 7,91), condutividade elétrica entre (139 a 221 µS cm^{-1}), oxigênio dissolvido (6,06 a 8,2 mg L^{-1}) e dureza (40 a 44).

Para *C. rigaudi*, os testes utilizando a substância de referência NaCl variaram de CE50-48h 0,85 a 1,08 g L^{-1}, indicando que a sensibilidade estava dentro da faixa esperada: 0,84 a 1,5 g L^{-1} (MIGUEL, 2020). Para *C. silvestrii*, os testes utilizando a substância de referência NaCl variaram de CE50-48h 1,09 a 1,47 g L^{-1}, indicando que a sensibilidade estava dentro da faixa esperada: 0,76 a 1,46 g L^{-1} (TAKENAKA, 2007).

Os valores de CE50 encontrados nas exposições agudas de *C. rigaudi* ao Cádmio e ao Clorpirifós isolados são apresentados na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de CE50-48h para *Ceriodaphnia. rigaudi* obtidos para cada exposição ao sal metal Cádmio e ao agrotóxico Clorpirifós isoladamente.

Composto	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Média	Desvio padrão
Cádmio (mg L^{-1})	0,021633	0,022602	0,018594	0,020164	0,020723	0,020743	0,00151
Clorpirifós (µg L^{-1})	0,064850	0,041811	0,043624	0,038655	0,049827	0,0477535	0,01038

Os valores de CE50 encontrados nas exposições de curto prazo de *C. silvestrii* ao Cádmio e ao Clorpirifós isoladamente nos testes de toxicidade aguda, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de CE50-48h para *Ceriodaphnia silvestrii* encontrados em cada exposição ao metal Cádmio e ao agrotóxico Clorpirifós, isoladamente.

Composto	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Média	Desvio padrão
Cádmio (mg L^{-1})	0,030346	0,025762	0,0276	0,027911	0,021369	0,026597	0,003342
Clorpirifós (µg L^{-1})	0,036671	0,104572	0,057562	0,060951	0,051161	0,062183	0,02545

4.3 Curvas de distribuição de sensibilidade das espécies (SSDs)

Com base na curva SSD para o Cádmio (Fig 1), é possível inferir que as espécies testadas neste trabalho*, C. rigaudi* e *C. silvestrii* são, respectivamente, a 11ª e a 14ª espécie mais sensível. Além disso, o grupo mais sensível ao Cádmio foi o dos peixes, sendo *Salmo trutta* a espécie mais sensível.

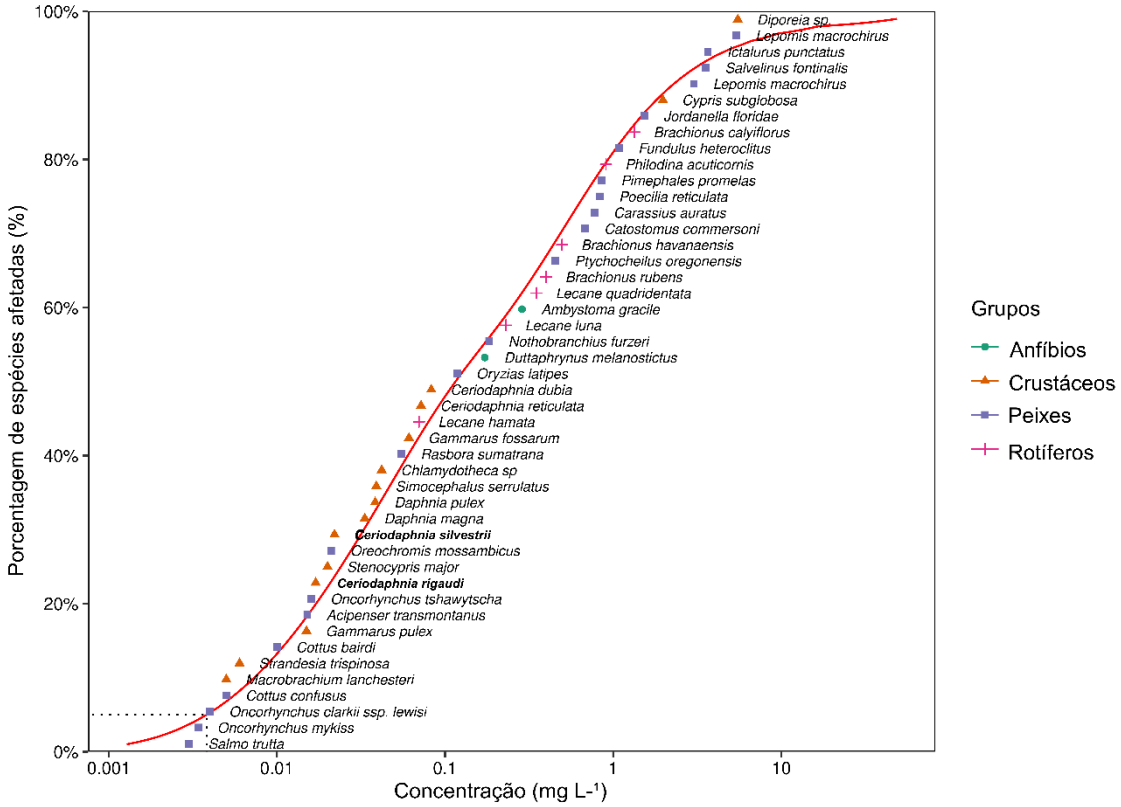


Fig 1 Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD) de anfíbios, crustáceos e peixes ao metal Cádmio.

Analisando a curva SSD relacionada ao Clorpirifós (Fig 2), pode-se dizer que as espécies testadas nesse trabalho (*C. silvestrii* e *C. rigaudi*) são, respectivamente, a segunda e terceira espécie mais sensíveis. Nesse caso, o grupo mais sensível foi o dos crustáceos, sendo *Daphnia ambigua* a espécie mais sensível.

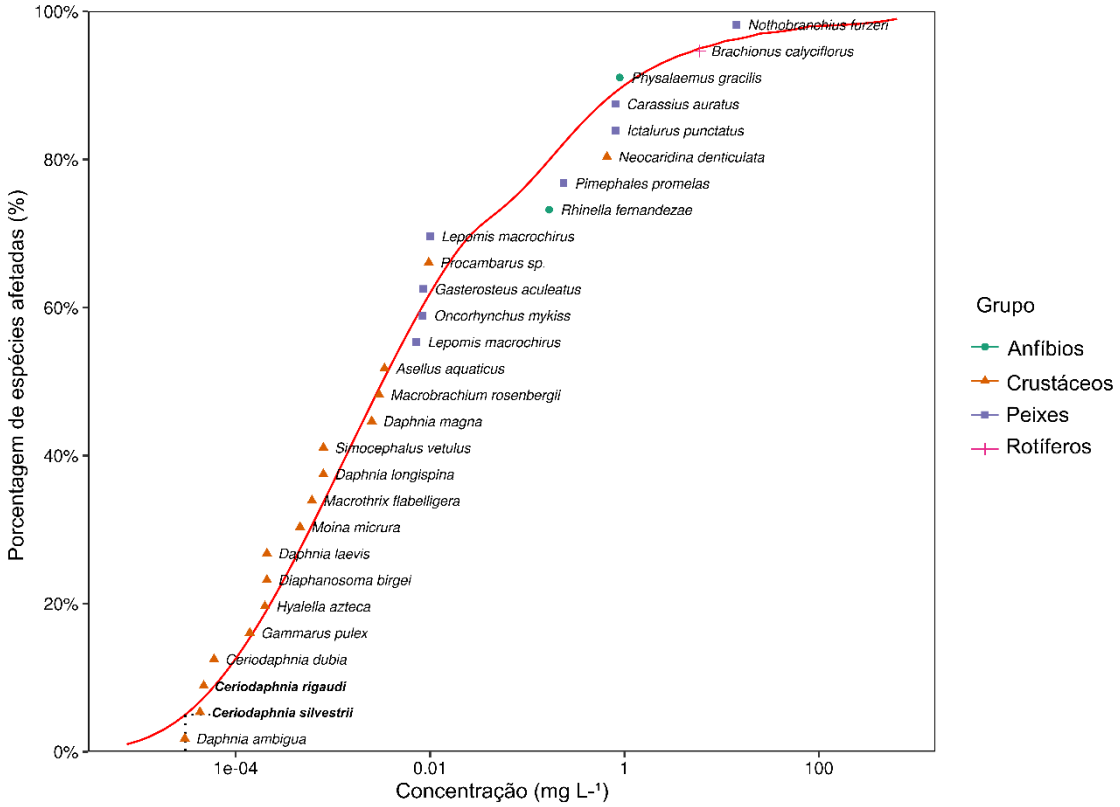


Fig 2 Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD) de anfíbios, crustáceos e peixes ao agrotóxico Clorpirifós.

Os valores médios das concentrações perigosas de Cádmio e Clorpirifós que afetam 5% (HC5) e 50% (HC50) de todas as espécies incluídas nas SSDs e seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95% são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Valores de concentrações perigosas para 5% (HC5) e 50% (HC50) das espécies e seus intervalos de confiança (95%) para as espécies incluídas nas SSDs.

Composto	HC5	IC 95%	HC50	IC 95%
Cádmio (µg L^{-1})	3,131	1,201-6,647	124,7	71,8-216,3
Clorpirifós (µg L^{-1})	9,964	1,077-50,6	5,717	1,67-19,55

3.4 Avaliação de Risco Ecológico

Os valores de Risco Ecológico (RQ) calculados a partir da razão entre as concentrações ambientais medidas (MEC) e a concentração sem efeito previsto (PNEC) encontram-se na Tabela 4. Conforme os resultados, o Cádmio representa alto risco desde a menor concentração. Já o Clorpirifós representa risco insignificante na menor concentração, enquanto risco baixo para a concentração mediana e alto para a maior concentração.

Tabela 4. Risco ambiental do metal Cádmio e do agrotóxico Clorpirifós expressos como quociente de risco ecológico (RQ), com base na concentração perigosa para 5% (HC5) das espécies incluídas nas SSDs.

Composto	PNEC	MEC mínimo	RQ mínimo	MEC mediano	RQ mediano	MEC máximo	RQ máximo
Cádmio (mg L^{-1})	0,000783	0,0009	1,15	0,006	7,67	7,66	9786,01
Clorpirifós (µg L^{-1})	2,491	0,0005	0,0002	0,13	0,052	0,36	0,144

4.5 Testes com misturas

Os dados obtidos através do teste de toxicidade aguda com a mistura de Cádmio e Clorpirifós para *C. rigaudi* se encaixaram ao modelo de referência de Adição de Concentração (CA), sem ocorrência de qualquer um dos três desvios do modelo – interações sinergéticas/antagônicas (S/A), desvio dependente de proporção da dose (DL) ou desvio dependente do nível da dose (DR) (Fig 3). O ajuste dos dados da mistura ao modelo CA produziu uma soma dos quadrados dos resíduos (SS) de 149,071 ($p<0,05$; $r^2 = 0,57$) (Tabela 1, Apêndice F).

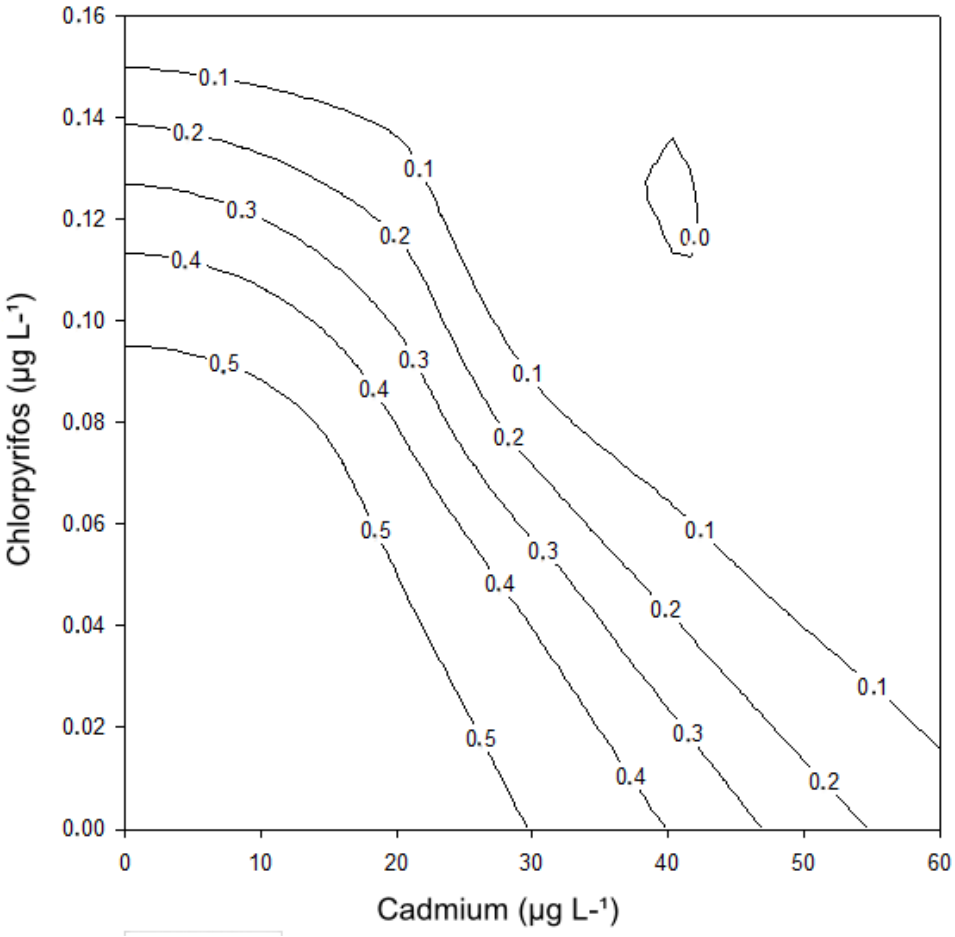


Fig 3 Isobolograma dos efeitos de mistura do cádmio e do clorpirifós para o cladócero *Ceriodaphnia rigaudi* evidenciando o ajuste ao modelo de referência de Adição da Concentração (CA), sem ocorrência de desvios em decorrência de interações (Ferramenta MIXTOX).

Para *C. silvestrii*, os dados obtidos por meio do teste de toxicidade aguda com a mistura de Cádmio e Clorpirifós se encaixaram ao modelo de referência de Ação independente (IA), com desvio dependente do nível da dose (DL), ocorrendo antagonismo em concentrações mais baixas de Cádmio (Fig 4). O ajuste dos dados da mistura ao modelo CA produziu uma soma dos quadrados dos resíduos (SS) de 43,05 ($p<0,05$; $r^2 = 0,90$) (Tabela 2, Apêndice F).

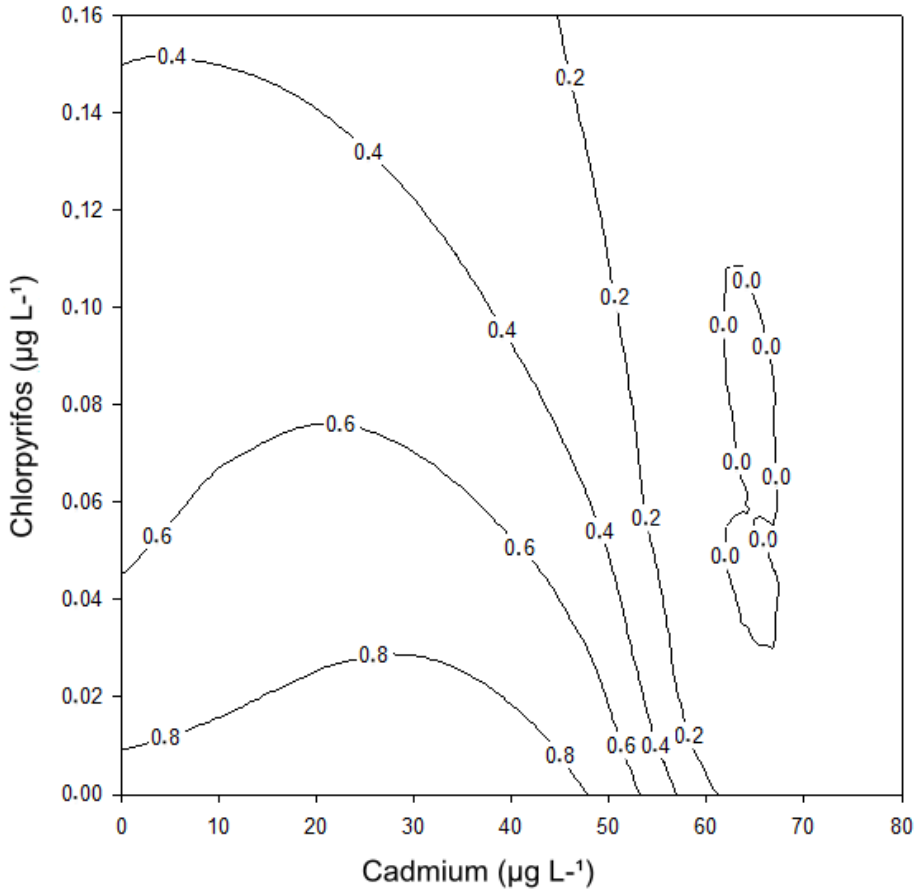


Fig 4 Isobolograma dos efeitos de misturas do cádmio e do clorpirifós para o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* evidenciando o ajuste ao modelo de referência de Ação Independente (IA), com desvio dependente do nível da dose (DL), ocorrendo antagonismo nas concentrações mais baixas de Cádmio (Ferramenta MIXTOX).

5. Discussão

Neste estudo os valores médios de CE50-48h obtidos para *C. rigaudi* (0,02 mg L^{-1}) exposta ao Cádmio foram cerca de dez vezes menores que os encontrados por (MOHAMMED, 2007) para a mesma espécie (CE50-48h de 0,2 mg L^{-1}), o que pode ser devido a diferenças nas características químicas do meio, como o valor de dureza, o qual utilizaram 90 a 100 mg L^{-1} e oxigênio dissolvido, o qual foram maiores que 4 mg L^{-1}. Comparada a outros cladóceros, os valores de CE50 obtidos para *C. silvestrii* (0,026 mg L^{-1}) foram também menores que os reportados por Biesinger & Christensen (1972) para *Daphnia magna* (CE50-48h de 0,065 mg L-^{1}), espécie de organismo-teste utilizada em protocolos padrão para os estudos de toxicidade em regiões temperadas. Ambas as espécies estudadas foram também mais sensíveis se comparadas com *Chydorus sphaericus* (CE50-48h de 0,149 mg L-1) (LALANDE; PINEL-ALLOUL, 1983). Já

a CE50-48h de Cádmio para *Daphnia galeata mendotae* descrita por MARSHALL (1979), foi de 0,04 mg L^{-1}, uma sensibilidade bem próxima, portanto, às espécies no presente estudo.

Além de cladóceros, a toxicidade do cádmio já foi documentada para diversos organismos, afetando o crescimento e reprodução de invertebrados aquáticos e microrganismos, causando hipocalcemia em peixes e afetando crescimento, abertura estomática, transpiração e fotossíntese em plantas (World Health Organization, 1992). A partir da SSD, entre os grupos analisados o dos peixes foi o mais sensível, sendo a espécie mais sensível *Salmo trutta*, o que é corroborado pelo trabalho de EATON; MCKIM; HOLCOMBE (1978), que indicaram que, entre os peixes, as espécies de salmonídeos são mais sensíveis ao cádmio.

No caso do Clorpirifós, os crustáceos mais sensíveis foram *Daphnia ambigua*, *C. silvestrii* e *C. rigaudi*, respectivamente, o que corrobora estudo anterior (Raymundo et al. 2019), no qual *C. silvestrii* foi o mais sensível entre os demais cladóceros analisados. Além disso, *C. rigaudi* mostrou uma sensibilidade ao Clorpirifós muito semelhante à encontrada por HARMON; SPECHT; CHANDLER (2003) para *Daphnia ambigua* (CE50-48h de 0,035 µg L^{-1}). A partir da SSD, entre os grupos estudados, o dos crustáceos foi o mais sensível, sendo as espécies de cladóceros mais sensíveis, o que é respaldado por (HANAZATO, 1991) e (HAVENS, 1994), que verificaram que cladóceros apresentam uma maior sensibilidade a substâncias tóxicas de origem antropogênica, como inseticidas, em comparação com outros grupos de zooplâncton.

Quanto à toxicidade das misturas de Cádmio e Clorpirifós, os resultados obtidos no presente trabalho para *C. rigaudi* diferiram do reportado por (YU et al., 2019), enquanto os resultados para *C. silvestrii*, para a qual encontramos efeitos antagônicos a depender da dose, é corroborado pelos mesmos autores. Yu et al. (2019), tendo como organismo-alvo o oligoqueto *Eisenia fetida*, encontrou antagonismo para a mistura binária Cloreto de Cádmio-Clorpirifós, para as misturas ternárias Cloreto de Cádmio-Atrazina-Clorpirifós, Cloreto de Cádmio-Clorpirifós-Lambda-cialotrina e Cloreto de Cádmio-Clorpirifós-Abamectina e para a mistura quaternária Cloreto de Cádmio-Atrazina-Clopirifós-Abamectina, enquanto sinergismo nesta mesma espécie foi verificado para as

misturas ternárias Cloreto de Cádmio-Atrazina-Clorpirifós-Lambda-cialotrina e Cloreto de Cádmio-Clorpirifós-Lambda-cialotrina-Abamectina e para a quaternária Cloreto de Cadmio-Atrazina-Clorpirifós- Lambda-cialotrina-Abamectina. Ambos os estudos indicam a ocorrência de antagonismo na toxicidade da mistura de cádmio e clorpirifós, mas ainda há poucos dados sobre os efeitos da mistura em diferentes organismos. Para entender a relevância ecológica dessa mistura, pesquisas futuras são necessárias, levando a mais informações e, consequentemente, seremos capazes de responder às lacunas em relação a este assunto.

O estudo de ZHAO et al. (2018) avaliou o risco do cádmio no Rio Longjiang, localizado na Região Autônoma Zhuang de Guangxi, China. O valor de HC5 para espécies selecionadas por esses autores baseado em NOECs (concentração sem efeito observado), que incluiu algas, anfíbios, plantas aquáticas, crustáceos, peixes, insetos, moluscos, vermes e outros invertebrados foi de 0,714 µg L^{-1}, um valor menor do que o obtido no presente estudo para peixes, anfíbios, rotíferos e crustáceos baseado em CL50 ou CE50. O risco ecológico calculado por ZHAO et al. (2018) foi alto (HQ>1) durante o período inicial da poluição causada por um acidente e baixo ou sem risco (HQ<1) aproximadamente 2 anos depois. No caso do presente estudo, o risco foi alto para rios brasileiros, similar ao início da poluição na China. Estas análises destacam a importância do monitoramento e gestão adequados dos recursos hídricos para proteger a saúde dos ecossistemas aquáticos.

Em um estudo sobre a toxicidade do Clorpirifós, RÄMÖ et al. (2018) produziu uma curva SSD para 159 espécies de peixes obtendo um HC5 de 6,94 µg L^{-1}, indicando um baixo risco para essas espécies. No presente estudo, o valor de HC5 obtido (9,96 µg L^{-1}) foi similar ao de RÄMÖ et al. (2018), apesar de nossa inclusão de grupos mais sensíveis como os crustáceos na SSD.

Segundo a resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, para os padrões de qualidade de águas doces, o valor máximo permitido de Cádmio é de 0,001 mg L^{-1} (BRASIL, 2005). Porém, de acordo com os dados analisados nesse trabalho, essa concentração já apresentaria um risco médio para as espécies consideradas. Além disso, valores superiores ao máximo permitido já foram relatados em águas dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Amazonas,

Amapá, Paraná e Sergipe (Apêndice C, Tabela 1). Sendo assim, a partir dos resultados de toxicidade e da avaliação de risco ecológico encontrados no presente trabalho, esses valores não seriam seguros para as espécies avaliadas. Segundo os dados deste trabalho, para que a concentração ambiental medida representasse baixo risco a essas espécies, o valor deveria ser abaixo de 0,078 µg L^{-1}.

A resolução do CONAMA não contempla o Clorpirifós e assim como no caso do Cádmio, os resultados encontrados no presente trabalho a partir de concentrações ambientais medidas (Apêndice C, Tabela 2), indicam que esses valores não são seguros para as espécies consideradas. Ainda segundo nossos dados, um valor que representaria risco insignificante para essas espécies deveria estar abaixo de 0,025 µg L^{-1}.

6. Conclusões

No presente trabalho, tanto o Cádmio quanto o Clorpirifós de forma isolada causaram efeitos letais nos cladóceros *C. rigaudi* e *C. silvestrii*. Em mistura, os compostos resultaram em efeito aditivo para *C. rigaudi* e antagônico dependente do nível da dose para *C. silvestrii*, não corroborando a hipótese inicial de que a toxicidade dos compostos em mistura seria maior do que a somatória da toxicidade destes compostos isolados

A avaliação de risco ecológico realizada neste trabalho apontou que as concentrações ambientais medidas para ambos os compostos não seriam seguras para as espécies consideradas na SSD.

Tanto *Ceriodaphnia rigaudi* quanto *Ceriodaphnia silvestrii,* foram sensíveis e adequadas como organismo-teste nativo para ensaios ecotoxicológicos com metais e agrotóxicos, sendo mais sensíveis que *Ceriodaphnia dubia* e a maioria das espécies de microcrustáceos utilizadas na avaliação de toxicidade destes compostos. Devem, portanto, ser utilizadas de forma a aumentar a relevância ecológica em avaliações de risco dos compostos testados para ecossistemas aquáticos em regiões tropicais.

Referências

ALDENBERG, T.; JAWORSKA, J. S. Uncertainty of the Hazardous Concentration and Fraction Affected for Normal Species Sensitivity Distributions**. Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, n. 1, p. 1–18, maio 2000.

ANVISA, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Monografia C-20**. https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4226json-file-1/view, 2021.

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373: Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera).** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.abnt.org.br>.

BABY, J. et al. Toxic effect of heavy metals on aquatic environment. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 4, n. 4, 7 jan. 2011.

BLISS, C. I. THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY1. **Annals of Applied Biology**, v. 26, n. 3, p. 585–615, ago. 1939.

BRASIL, R. C. N°357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. **Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional**. Publicado no D.O.U., 2005.

CETESB, S. P. **Diagnóstico da contaminação de águas superficiais, subterrâneas e sedimentos por agrotóxicos**. São Paulo: [s.n.].

CONAMA, Conselho Nacional Do Meio Ambiente. **Resolução no 357, 17 de março de 2005**. https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdfMinistério Do Meio Ambiente, 2005.

EATON, J. G.; MCKIM, J. M.; HOLCOMBE, G. W. Metal toxicity to embryos and larvae of seven freshwater fish species—i. cadmium**. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 95–103, jan. 1978.

EL-NAHHAL, I.; EL-NAHHAL, Y. Pesticide residues in drinking water, their potential risk to human health and removal options. **Journal of Environmental Management**, v. 299, p. 113611, dez. 2021.

EPA. **Guidelines for Ecological Risk Assessment**. U.S. Environmental Protection Agency - EPA/630/R-95/002F Washington, 1998.

EPA. Ceriodaphnia dubia, Survival and Reproduction Test; Chronic Toxicity Excerpt from: **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.epa.gov>.

FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute Toxicity Tests with the Tropical Cladoceran Pseudosida ramosa: The Importance of Using Native Species as Test Organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 241–249, 13 fev. 2011.

GAUTAM, R. K. et al. Contamination of Heavy Metals in Aquatic Media: Transport, Toxicity and Technologies for Remediation. Em: **Heavy Metals In Water**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2014. p. 1–24.

GOMES, D. F. et al. Ecological risk assessment for metals in sediment and waters from the Brazilian Amazon region. **Chemosphere**, v. 345, p. 140413, dez. 2023.

HANAZATO, T. Effects of repeated application of carbaryl on zooplankton communities in experimental ponds with or without the predator Chaoborus. **Environmental Pollution**, v. 74, n. 4, p. 309–324, 1991.

HARMON, S. M.; SPECHT, W. L.; CHANDLER, G. T. A Comparison of the Daphnids Ceriodaphnia dubia and Daphnia ambigua for Their Utilization in Routine Toxicity Testing in the

Southeastern United States. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 79–85, 1 jul. 2003.

HAVENS, K. E. An experimental comparison of the effects of two chemical stressors on a freshwater zooplankton assemblage. **Environmental Pollution**, v. 84, n. 3, p. 245–251, 1994.

IBAMA, Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**.

ISO. **Water quality - Determination of long term toxicity of substances to Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea).** ISO 10706:2000, abr. 2000.

JONKER, M. J. et al. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level–dependent, or dose ratio–dependent effects in mixture dose–response analysis**. Environmental Toxicology and Chemistry,** v. 24, n. 10, p. 2701–2713, 2005.

LAABS, V. et al. Pesticides in Surface Water, Sediment, and Rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, n. 5, p. 1636–1648, set. 2002.

LALANDE, M.; PINEL-ALLOUL, B. Acute Toxicity of Cadmium, Copper, Mercury and Zinc to Chydorus Sphaericus (Cladocera) from Three Quebec Lakes. **Water Quality Research Journa**l, v. 18, n. 1, p. 103–114, 1 fev. 1983.

LIMA, D. P. DE et al. Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 4, p. 405–414, dez. 2015.

LIU, P. et al. Assessment of chlorpyrifos exposure and absorbed daily doses among infants living in an agricultural area of the Province of Jiangsu, China. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 87, n. 7, p. 753–762, 21 out. 2014.

MANSANO, A. S. et al. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae Raphidocelis subcapitata. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 312–321, ago. 2017.

MANSANO, A. S. et al. Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran Ceriodaphnia silvestrii. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 13335–13346, 21 maio 2018.

MANSANO, A. S. et al. Individual and mixture toxicity of carbofuran and diuron to the protozoan Paramecium caudatum and the cladoceran Ceriodaphnia silvestrii. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 201, p. 110829, set. 2020.

MARSHALL, J. S. Cadmium toxicity to laboratory and field populations ofDaphnia galeata mendotae. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 453–457, jan. 1979.

MARTINS, S. E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 7, p. 1866, 2011.

MIGUEL, M. **Efeito do hormônio sintético 17-etinilestradiol e do herbicida atrazina em espécies de dois níveis tróficos**. Tese (Doutorado em Ciência) —São Carlos: Universidade de São Paulo, 13 abr. 2020.

MOHAMMED, A. Comparative sensitivities of the tropical cladoceran, Ceriodaphnia rigaudii and the temperate species Daphnia magna to seven toxicants. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 347–352, abr. 2007.

MOREIRA, R. A. et al. Life-History Traits Response to Effects of Fish Predation (Kairomones), Fipronil and 2,4-D on Neotropical Cladoceran Ceriodaphnia silvestrii**. Archives of Environmental Contamination and Toxicology,** v. 79, n. 3, p. 298–309, 28 out. 2020.

MORTEZA, Z. et al. An assessment of agricultural pesticide use in Iran, 2012-2014. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 15, n. 1, p. 10, 24 dez. 2017.

OLIVEIRA, H. S. P.; FRANÇA, S. C. A.; ROCHA, E. J. P. Atividades de mineração e avaliação de metais em água superficial, sedimento de fundo e peixes no Rio Tapajós. Em: **Amazônia em tempo: estudos climáticos e socioambientais**. Belém: Embrapa, 2015. p. 195–222.

PÉREZ, J. et al. Growth rate of Pseudokirchneriella subcapitata exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1167–1175, 30 ago. 2011.

RÄMÖ RA, VAN DEN BRINK PJ, RUEPERT C, et al. Environmental risk assessment of pesticides in the River Madre de Dios, Costa Rica using PERPEST, SSD, and msPAF models. **Environmental Science and Pollution Research** 25:13254–13269. 2018.

RAYMUNDO, L. B. et al. Sensitivity of tropical cladocerans to chlorpyrifos and other insecticides as compared to their temperate counterparts. **Chemosphere**, v. 220, p. 937–942, abr. 2019.

RIBEIRO, E. V. et al. Metais Pesados e Qualidade da Água do Rio Sao Francisco no Seguimento entre Três Marias e Pirapora - MG: Índice de contaminação. **Geonomos**, 31 jul. 2012.

RUIZ-ARIAS, M. A. et al. The situation of chlorpyrifos in Mexico: a case study in environmental samples and aquatic organisms. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 45, n. 8, p. 6323–6351, 10 ago. 2023.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; BASKARAN, S.; KENNEDY, I. R. Ecological relative risk (EcoRR): another approach for risk assessment of pesticides in agriculture. **Agriculture, Ecosystems & Environment,** v. 91, n. 1–3, p. 37–57, set. 2002.

SOBHA, K. et al. A Study on Biochemical Changes in the Fresh Water Fish, <i>Catla catla</i> (Hamilton) Exposed to the Heavy Metal Toxicant Cadmium Chloride. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 3, n. 2, p. 1–11, 1 jan. 1970.

SOLOMON, K. R. et al. Properties and Uses of Chlorpyrifos in the United States. Em: GIESY, J. P.; SOLOMON, K. R. (Eds.). **Aquatic Systems in the United States**. 231. ed. Summerfield: Springer Open, 2014. p. 13–30.

STATSOFT. **Statistica** (data analysis software system), 2014. Disponível em: <www.statsoft.com>. Acesso em: 16 abr. 2023

TAKENAKA, R. A. **Avaliação da toxicidade de Microcystis aeruginosa e de florações naturais de cianobactérias de reservatórios do Rio Tietê, SP**. Tese (Doutorado)—São Carlos, SP: Universidade de São Paulo, 2007.

THORLEY, J.; SCHWARZ, C. ssdtools: An R package to fit Species Sensitivity Distributions. **Journal of Open Source Software**, v. 3, n. 31, p. 1082, 29 nov. 2018.

VILLAR, D.; SCHAEFFER, D. J. Chlorpyrifos should be banned in agriculture and livestock production in Colombia. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 35, n. 2, p. 61–67, 5 abr. 2022.

WANG, P. et al. Cadmium and chlorpyrifos inhibit cellular immune response in spleen of rats. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 7, p. 1927–1936, jul. 2017.

YAN, F. et al. Ecological Risk Evaluation of Baihetan Dam Based on Fuzzy Hazard Quotient Model. **Water**, v. 14, n. 17, p. 2694, 30 ago. 2022.

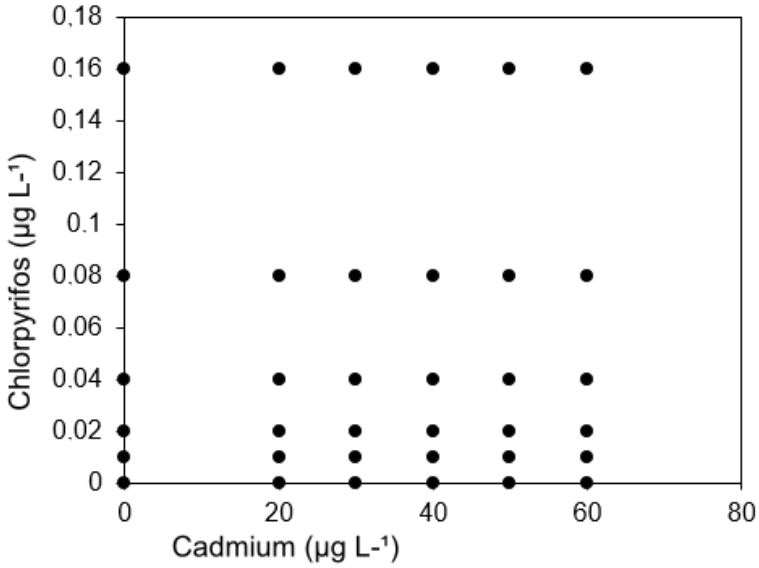
YU, Y. et al. Joint toxic effects of cadmium and four pesticides on the earthworm (Eisenia fetida). **Chemosphere,** v. 227, p. 489–495, jul. 2019.

ZHAO, Q.; DOURSON, M.; GADAGBUI, B. A review of the reference dose for chlorpyrifos. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 111–124, mar. 2006.

ZHAO X-M, YAO L-A, MA Q-L, et al. Distribution and ecological risk assessment of cadmium in water and sediment in Longjiang River, China: Implication on water quality management after pollution accident. **Chemosphere** 194:107–116. 2018.

APÊNDICE

Apêndice A – Desenho experimental do teste de toxicidade aguda com misturas de Clorpirifós e Cádmio



Apêndice B – Dados utilizados para a construção da Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies (SSD)

Tabela 1. Dados de toxicidade utilizados para a construção da SSD do Cádmio.

Composto	Espécie	Grupo	Endpoint	Concentração (mg L^{-1})	Somente Cádmio (mg L^{-1})	Referencias
CdCl2 5H20	*Ptychocheilus oregonensis*	Peixes	LC50 96H	1.104	0.454	(Andros and Garton 1980)
Cdcl2 2 1/2H20	*Pimephales promelas*	Peixes	LC50 96H	2.13	1.184	(Benson and Birge 1985)
CdCl2	*Cottus bairdi*	Peixes	LC50 96H	0.017	0.010	(Besser et al. 2007)
CdCl2	*Oncorhynchus mykiss*	Peixes	LC50 96H	0.0052	0.003	(Besser et al. 2007)
CdCl2 2H20	*Lepomis macrochirus*	Peixes	LC50 96H	2.3	1.285	(Bishop and McIntosh 1981)
Cdcl2 2 1/2H20	*Oncorhynchus mykiss*	Peixes	LC50 96H	0.0051	0.002	(Calfee et al. 2014)
Cdcl2 2 1/2H20	*Acipenser transmontanus*	Peixes	LC50 96H	0.128	0.071	(Calfee et al. 2014)
Cdcl2 2 1/2H20	*Oryzias latipes*	Peixes	LC50 96H	0.213	0.118	(Canton and Slooff 1982)
Cdcl2 2 1/2H20	*Poecilia reticulata*	Peixes	LC50 96H	6.494	3.610	(Canton and Slooff 1982)
CdCl2	*Oreochromis mossambicus*	Peixes	LC50 96H	0.03483	0.021	(Chang et al. 1998)
CdCl2	*Oncorhynchus tshawytscha*	Peixes	LC50 96H	0.026	0.016	(Chapman 1978)
CdCl2	*Oncorhynchus mykiss*	Peixes	LC50 96H	0.027	0.016	(Chapman 1978)
CdCl2	*Catostomus commersoni*	Peixes	LC50 96H	1.11	0.680	(Duncan and Klaverkamp 1983)
CdCl2	*Pimephales promelas*	Peixes	LC50 96H	0.126	0.077	(Erten-Unal et al. 1998)
CdCl2	*Salvelinus fontinalis*	Peixes	LC50 96H	5.8	3.555	(Holcombe et al. 1983)
CdCl2	*Oncorhynchus mykiss*	Peixes	LC50 96H	0.00514	0.003	(Ingersoll and Mebane 2014)
CdCl2	*Acipenser transmontanus*	Peixes	LC50 96H	0.01168	0.007	(Ingersoll and Mebane 2014)
CdCl2	*Carassius auratus*	Peixes	LC50 96H	2.13	1.306	(McCarty et al. 1978)
CdCl2	*Cottus confusus*	Peixes	LC50 96H	0.009	0.005	(Mebane et al. 2012)
CdCl2	*Oncorhynchus clarkii ssp. lewisi*	Peixes	LC50 96H	0.006	0.004	(Mebane et al. 2012)
CdCl2	*Oncorhynchus mykiss*	Peixes	LC50 96H	0.0046	0.003	(Naddy et al. 2015)
Cdcl2 2 1/2H20	*Nothobranchius furzeri*	Peixes	LC50 96H	0.33	0.183	(Philippe et al. 2018)
CdCl2	*Lepomis macrochirus*	Peixes	LC50 96H	6.47	3.966	(Phipps and Holcombe 1985)
CdCl2	*Ictalurus punctatus*	Peixes	LC50 96H	4.48	2.746	(Phipps and Holcombe 1985)
CdCl2	*Pimephales promelas*	Peixes	LC50 96H	1.5	0.919	(Phipps and Holcombe 1985)
CdCl2	*Carassius auratus*	Peixes	LC50 96H	0.748	0.458	(Phipps and Holcombe 1985)
CdCl2	*Oncorhynchus mykiss*	Peixes	LC50 96H	0.003	0.002	(Phipps and Holcombe 1985)
CdCl2	*Pimephales promelas*	Peixes	LC50 96H	3.42	2.096	(Sherman et al. 1987)
CdCl2	*Pimephales promelas*	Peixes	LC50 96H	2.856	1.750	

CdCl2 2 1/2H20	*Rasbora sumatrana*	Peixes	LC50 96H	0.1	0.055	(Shuhaimi-Othman et al. 2013)
CdCl2 2 1/2H20	*Poecilia reticulata*	Peixes	LC50 96H	0.17	0.094	(Shuhaimi-Othman et al. 2013)
CdCl2	*Jordanella floridae*	Peixes	LC50 96H	2.5	1.532	(Spehar 1976)
CdCl2	*Salmo trutta*	Peixes	LC50 96H	0.0045	0.003	(Spehar and Carlson 1984)
CdCl2	*Pimephales promelas*	Peixes	LC50 96H	2.083	1.276	(Spehar and Carlson 1984)
CdCl2	*Ictalurus punctatus*	Peixes	LC50 96H	7.94	4.867	(Spehar and Carlson 1984)
CdCl2	*Lepomis macrochirus*	Peixes	LC50 96H	8.81	5.400	(Spehar and Carlson 1984)
CdCl2	*Oncorhynchus mykiss*	Peixes	LC50 96H	0.0048	0.003	(Spehar and Carlson 1984)
Cdcl2 2 1/2H20	*Fundulus heteroclitus*	Peixes	LC50 96H	1.949	1.083	(Voyer et al. 1975)
CdCl2 H20	*Poecilia reticulata*	Peixes	LC50 96H	30.4	1.696	(Yılmaz et al. 2004)
CdCl2	*Ambystoma gracile*	Anfíbios	LC50 96H	0.468	0.287	(Nebeker et al. 1995)
Cdcl2 2 1/2H20	*Duttaphrynus melanostictus*	Anfíbios	LC50 96H	0.3	0.167	(Shuhaimi-Othman et al. 2012)
Cdcl2 2 1/2H20	*Duttaphrynus melanostictus*	Anfíbios	LC50 96H	0.32	0.178	(Shuhaimi-Othman et al. 2013)
CdCl2	*Simocephalus serrulatus*	Crustaceans	LC50 48H	0.0645	0.039	(Spehar and Carlson 1984)
CdCl2 5H20	*Macrobrachium lanchesteri*	Crustáceos	LC50 96H	0.0127	0.005	(Shuhaimi-Othman et al. 2011)
CdCl2	*Diporeia sp.*	Crustáceos	LC50 96H	8.985	5.508	(Gossiaux et al. 1992)
CdCl2 5H20	*Stenocypris major*	Crustáceos	LC50 96H	0.0507	0.020	(Shuhaimi-Othman et al. 2013)
Cdcl2 2 1/2H20	*Daphnia magna*	Crustáceos	LC50 48H	0.03	0.017	(Canton and Slooff 1982)
CdCl2	*Ceriodaphnia dubia*	Crustáceos	LC50 48H	0.0545	0.034	(Diamond et al. 1997)
CdCl2	*Daphnia magna*	Crustáceos	LC50 48H	0.008	0.005	(Erten-Unal et al. 1998)
CdCl2	*Daphnia magna*	Crustáceos	LC50 48H	0.0095	0.006	(Guilhermino et al. 1996)
CdCl2	*Gammarus pulex*	Crustáceos	LC50 96H	0.025	0.015	(McCahon et al. 1988)
CdCl2	*Daphnia magna*	Crustáceos	LC50 48H	0.0374	0.023	(Nebeker et al. 1986)
CdCl2	*Daphnia pulex*	Crustáceos	LC50 48H	0.064	0.039	(Niederlehner 1984)
Cdcl2 2 1/2H20	*Ceriodaphnia reticulata*	Crustáceos	LC50 48H	0.129	0.072	(Spehar and Carlson 1984)
Cdcl2 2 1/2H20	*Daphnia magna*	Crustáceos	LC50 48H	0.166	0.092	(Spehar and Carlson 1984)
Cdcl2 2 1/2H20	*Daphnia pulex*	Crustáceos	LC50 48H	0.0701	0.038	(Allan Stackhouse and Benson 1988)

CdCl2 H20	***Ceriodaphnia rigaudi***	**Crustáceos**	**EC50 (imobilidade) 48H**	**0.03**	**0.017**	**Esse trabalho**
CdCl2 H20	***Ceriodaphnia silvestrii***	**Crustáceos**	**EC50 (imobilidade) 48H**	**0.04**	**0.022**	**Esse trabalho**
CdCl2	*Daphnia magna*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	2.07	1.269	(Loureiro et al. 2011)
CdCl2	*Ceriodaphnia dubia*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	0.33	0.202	(Naddy et al. 2015)
CdCl2	*Gammarus fossarum*	Crustáceos	EC50 (mortalidade e imbolidade) 96H	0.1	0.061	(Alonso et al. 2010)
CdCl2	*Strandesia trispinosa*	Crustáceos	LC50 48H	0.01	0.006	(Lima et al. 2019)
CdCl2	*Chlamydotheca sp*	Crustáceos	LC50 48H	0.07	0.042	(Lima et al. 2019)
CdCl2	*Cypris subglobosa*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	3.22	1.974	(Khangarot and Das 2009)
Cd	*Lecane quadridentata*	Rotíferos	LC50 48H	0.28	0.280	(Pérez-Legaspi and Rico-Martínez 2001)
Cd	*Lecane luna*	Rotíferos	LC50 48H	0.35	0.350	(Pérez-Legaspi and Rico-Martínez 2001)
Cd	*Lecane hamata*	Rotíferos	LC50 48H	0.23	0.230	(Pérez-Legaspi and Rico-Martínez 2001)
Cd	*Brachionus calyiflorus*	Rotíferos	EC50 48H (reprodução)	0.07	0.070	(Snell and Moffat 1992)
Cd	*Brachionus calyiflorus*	Rotíferos	LC50 48H	1.3	1.30	(Snell 1991)
Cd	*Brachionus calyiflorus*	Rotíferos	LC50 24H	1.3	1.30	(Snell et al. 1991)
Cd	*Brachionus calyiflorus*	Rotíferos	LC50 48H	1.3	1.30	(Snell and Moffat 1992)
Cd	*Brachionus calyiflorus*	Rotíferos	LC50 24H	1.3	1.30	(Snell 1991)
Cd	*Philodina acuticornis*	Rotíferos	EC50 48H (imobilidade)	1.5	1.50	(Buikema et al. 1974)
CdCl2	*Philodina acuticornis*	Rotíferos	EC50 24H (imobilidade)	6.2	3.800	(Buikema et al. 1974)
CdCl2	*Philodina acuticornis*	Rotíferos	EC50 48H (imobilidade)	1.4	0.859	(Buikema et al. 1974)
CdCl2	*Philodina acuticornis*	Rotíferos	EC50 96H (imobilidade)	0.5	0.306	(Buikema et al. 1974)
CdCl2	*Philodina acuticornis*	Rotíferos	EC50 96H (imobilidade)	0.5	0.306	(Buikema et al. 1974)
CdCl2	*Philodina acuticornis*	Rotíferos	EC50 24H (imobilidade)	11.5	7.049	(Buikema et al. 1974)
CdCl2	*Brachionus havanaensis*	Rotíferos	LC50 24H	0.419	0.257	(Juárez-Franco et al. 2007)
CdCl2	*Brachionus rubens*	Rotíferos	LC50 24H	0.81	0.496	(Snell et al. 1991)
CdCl2	*Brachionus calyciflorus*	Rotíferos	LC50 24H	0.65	0.399	(Couillard et al. 1989)

Tabela 2. Dados de toxicidade utilizados para a construção da Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies (SSD) do agrotóxico Clorpirifós.

Composto	Espécie	Grupo	Endpoint	Concentração (mg L^{-1})	Referencias
Ingrediente ativo	*Rhinella fernandezae*	Anfíbios	LC50 96H	0.168	(Ruiz de Arcaute et al. 2015)
Ingrediente ativo	*Physalaemus gracilis*	Anfíbios	LC50 96H	0.893	(Rutkoski et al. 2020)
Ingrediente ativo	*Asellus aquaticus*	Crustáceos	LC50 48H	0.0034	(Augusiak and Van den Brink 2016)
Ingrediente ativo	*Ceriodaphnia dubia*	Crustáceos	LC50 48H	0.0001	(Bailey et al. 1997)
Ingrediente ativo	*Ceriodaphnia dubia*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	0.00008	(Brooke 1995)
Ingrediente ativo	*Daphnia magna*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	0.00025	(Brooke 1995)
Ingrediente ativo	*Daphnia magna*	Crustáceos	LC50 48H	0.00122	(Demetrio et al. 2014)
Ingrediente ativo	*Daphnia magna*	Crustáceos	LC50 48H	0.0037	(Guilhermino et al. 2000)
Ingrediente ativo	*Daphnia ambigua*	Crustáceos	LC50 48H	0.00003	(Harmon et al. 2003)
Ingrediente ativo	*Ceriodaphnia dubia*	Crustáceos	LC50 48H	0.00005	(Harmon et al. 2003)
Ingrediente ativo	*Daphnia magna*	Crustáceos	LC50 48H	0.001	(Kersting and van Wijngaarden 1992)
Ingrediente ativo	*Hyalella azteca*	Crustáceos	LC50 48H	0.001	(Moore et al. 1998)
Ingrediente ativo	*Daphnia magna*	Crustáceos	LC50 48H	0.006	(Moore et al. 1998)
Ingrediente ativo	*Neocaridina denticulata*	Crustáceos	LC50 48H	0.66	(Rubach et al. 2011)
Ingrediente ativo	*Daphnia magna*	Crustáceos	LC50 48H	0.02743	(Rubach et al. 2011)
Ingrediente ativo	*Gammarus pulex*	Crustáceos	LC50 48H	0.00043	(Rubach et al. 2011)
Ingrediente ativo	*Procambarus sp.*	Crustáceos	LC50 48H	0.00275	(Rubach et al. 2011)
Ingrediente ativo	*Procambarus sp.*	Crustáceos	LC50 48H	0.03481	(Rubach et al. 2011)
Ingrediente ativo	*Macrobrachium rosenbergii*	Crustáceos	LC50 48H	0.003	(Satapornvanit et al. 2009)
Ingrediente ativo	*Daphnia longispina*	Crustáceos	LC50 96H	0.0008	(van Wijngaarden et al. 1993)
Ingrediente ativo	*Simocephalus vetulus*	Crustáceos	LC50 96H	0.0008	(van Wijngaarden et al. 1993)
Ingrediente ativo	*Gammarus pulex*	Crustáceos	LC50 96H	0.00008	(van Wijngaarden et al. 1993)
Ingrediente ativo	***Ceriodaphnia rigaudi***	**Crustáceos**	**EC50 (imobilidade) 48H**	**4.70E-05**	**Esse trabalho**
Ingrediente ativo	***Ceriodaphnia silvestrii***	**Crustáceos**	**EC50 (imobilidade) 48H**	**6.20E-05**	**Esse trabalho**
Ingrediente ativo	*Ceriodaphnia dubia*	Crustáceos	EC50 (taxa de crescimento populaiconal) 10 dias	6.00E-05	(Barata et al. 2012)
Ingrediente ativo	*Hyalella azteca*	Crustáceos	LC50 48H	4.00E-05	(Deanovic et al. 2013)

Ingrediente ativo	*Daphnia magna*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	0.00712	(Liu et al. 2012)
Ingrediente ativo	*Daphnia magna*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	0.00121	(Echeverri-Jaramillo et al. 2020)
Ingrediente ativo	*Ceriodaphnia silvestrii*	Crustáceos	EC50 (immobility) 48H	3.00E-05	(Raymundo et al. 2019)
Ingrediente ativo	*Diaphanosoma birgei*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	0.00021	(Raymundo et al., 2019)
Ingrediente ativo	*Daphnia laevis*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	0.00021	(Raymundo et al., 2019)
Ingrediente ativo	*Moina micrura*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	0.00046	(Raymundo et al., 2019)
Ingrediente ativo	*Macrothrix flabelligera*	Crustáceos	EC50 (imobilidade) 48H	0.00061	(Raymundo et al., 2019)
Ingrediente ativo	*Pimephales promelas*	Peixes	LC50 96H	0.203	Holcombe et al, 1982
Ingrediente ativo	*Oncorhynchus mykiss*	Peixes	LC50 96H	0.008	(Holcombe et al. 1983)
Ingrediente ativo	*Pimephales promelas*	Peixes	LC50 30 days	0.12	(Jarvinen et al. 1983)
Ingrediente ativo	*Nothobranchius furzeri*	Peixes	LC50 96H	14.22	(Philippe et al. 2018)
Ingrediente ativo	*Pimephales promelas*	Peixes	LC50 96H	0.542	(Phipps and Holcombe 1985)
Ingrediente ativo	*Lepomis macrochirus*	Peixes	LC50 96H	0.01	(Phipps and Holcombe 1985)
Ingrediente ativo	*Ictalurus punctatus*	Peixes	LC50 96H	0.806	(Phipps and Holcombe 1985)
Ingrediente ativo	*Carassius auratus*	Peixes	LC50 96H	0.806	(Phipps and Holcombe 1985)
Ingrediente ativo	*Oncorhynchus mykiss*	Peixes	LC50 96H	0.009	(Phipps and Holcombe 1985)
Ingrediente ativo	*Lepomis macrochirus*	Peixes	LC50 96H	0.00724	(Siefert et al. 1989)
Ingrediente ativo	*Gasterosteus aculeatus*	Peixes	LC50 96H	0.0085	(van Wijngaarden et al. 1993)
Ingrediente ativo	*Brachionus calyciflorus*	Rotíferos	EC50 48H (reproduciton)	0,36	(Snell and Moffat 1992)
Ingrediente ativo	*Brachionus calyciflorus*	Rotíferos	LC50 24H	11,9	(Snell 1991)
Ingrediente ativo	*Brachionus calyciflorus*	Rotíferos	LC50 24H	12	(Snell et al. 1991)
Ingrediente ativo	*Brachionus calyciflorus*	Rotíferos	LC50 24H	11,85	(Ferrando and Andreu-Moliner 1991)
Ingrediente ativo	*Brachionus calyciflorus*	Rotíferos	LC50 48H	12	(Snell 1991)

Apêndice C – Valores de MEC utilizados para a Avaliação de Risco Ecológico (ARE)

Tabela 1. Valores de MEC de Cádmio utilizados para a ARE.

Cidade	Estado	Rio	MEC (mg L^{-1})	Método de quantificação	Referência
Manaus	AM	Rio Negro	0,18	EAA	(PINTO et al., 2009)
Manaus	AM	Bacia do Tarumã-Açu	5	EAA	(SANTANA; BARRONCAS, 2007)
Lourenço	AP	Rio Cassiporé	0,164	EAA	(LIMA et al., 2015b)
Ipuiúna	MG	Rio Pardo	0,001	ICP-MS	(ALVES et al., 2014)
São Carlos	SP	Rios Feijão e Monjolinho	0,019	EAA	(CHIBA et al., 2011)
Taquara	RS	Rio Sinos	0,0009	ICP-MS	(WEBER et al., 2013)
Curitiba	PR	Rio Iguaçu	0,0016	FAAS	(YAMAMOTO et al., 2016)
Viçosa	MG	Rio Turvo Sujo	0,003	EAA	(BARROS et al., 2009)
Rio de Janeiro	RJ	Baía de Sepetiba	0,009	ICP-MS	(FERREIRA; HORTA; CUNHA, 2010)
São Cristóvão	SE	Rio Pitanga	0,003	ICP-OES	(E SILVA et al., 2018)
Manaus	AM	Bacia dos Educandos	7,66	FAAS	(DA SILVA, 2010)
Santana	AM	Rio Amazonas	0,001	EAA	(DA SILVA FURTADO, 2016)
Vera	MT	Rio do Sono e Araguaia	0,003	FAAS	(DUARTE, 2013)

Cachoeiras de Macacu	RJ	Bacia do Rio São João	0,013	EAA	(ALMEIDA, 2012)

Tabela 2. Valores de Concentrações Ambientais Medidas (MEC) de Clorpirifós utilizados para a Avaliação de Risco Ecológico (ARE).

Cidade	Estado	Rio	MEC (µg L^{-1})	Método de quantificação	Referência
Lucas do Rio Verde	MT	Não informado	0,12	HPLC	(MOREIRA et al., 2012)
Agudo	RS	Bacia Nova Boemia	0,19	HPLC	(BORTOLUZZI et al., 2007)
Arvorezinha	RS	Bacia Candido Brum	0,29	HPLC	(BORTOLUZZI et al., 2007)
Cristal	RS	Bacia Passo Meio	0,22	HPLC	(BORTOLUZZI et al., 2007)
Agudo	RS	Bacia do Jacuí	0,13	HPLC	(SEQUINATTO et al., 2013)
Cuiabá	MT	Bacia do Pantanal	0,003	GC-MS	(LAABS et al., 2002)
Ribeirão Preto	SP	Ribeirão Preto	0,36	LC-MS	(CETESB, 2021)
Manaus	AM	Igarapé do Mindu	0,0005	GC-MS	(RICO et al., 2022)
Santarém	PA	Igarapé Urumari	0,0009	GC-MS	(RICO et al., 2022)

Macapá	AP	Igarapé das Mulheres	0,186	GC-MS	(RICO et al., 2022)
Belém	PA	Canal do Quintino	0,1	GC-MS	(RICO et al., 2022)

Apêndice D – Quantificação dos Cádmio

Tabela 1. Resultados e parâmetros de quantificação para Cádmio

Parâmetro	Valor nominal (mg L^{-1})	Valor quantificado (mg L^{-1})	Limite de detecção	Método referência
Cádmio	5,58	6,69±0,0018	0,0006	SMWW 3111 B

Apêndice E – Quantificação do Clorpirifós

Tabela 1. Resultados e parâmetros de quantificação para Clorpirifós

Parâmetro	Valor nominal (mg L^{-1})	Valor quantificado (mg L^{-1})	Limite de detecção (mg L^{-1})	Limite de quantificação (mg L^{-1})
Clorpirifós	1	1,445±0,186	0,004	0,015

Apêndice F – Testes com misturas

Tabela 1. Parâmetros e teste de ajuste do modelo de referência utilizando o MIXTOX aplicado à sobrevivência de *Ceriodaphnia rigaudi* exposta durante 48h à mistura de Cádmio e Clorpirifós

	Adição da concentração				Ação independente			
	CA	**S/A**	**DR**	**DL**	**IA**	**S/A**	**DR**	**DL**
Máx	**0,528832**	0,78	0,98	0,98	0,625862	0,98	0,98	0,98
β Cádmio	**5,108127**	5,107046	5,107046	5,10704647	39,50136	39,50136	39,50136	39,5013606
β Clorpirifós	**5721,549**	5721,549	5721,549	5721,54903	0,907707	0,907707	0,907707	0,90770726
CE50 Cádmio	**48,7978**	48,79742	48,79742	48,797 4227	49,93693	49,93693	49,93693	49,9369279
CE50 Clorpirifós	**0,159761**	0,131995	0,131995	0,1319952	-0,061067	-0,061067	-0,061067	-0,0610669
a	**-**	-0,0025	0	0	-	0	0	0
$b_{DL/DR}$	**-**	-	0	1	-	-	0	2
SS	**149,0911**	-	-	-	-	-	-	-
r^2	**0,57129203 7**	-	-	-	-	-	-	-
χ^2 ou teste F	**198,6773374**	-	-	-	-	-	-	-
df	**-**	1	2	2	-	1	2	2
p (χ^2/ F)	**7,23157E-42**	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2. Parâmetros e teste de ajuste do modelo de referência utilizando o MIXTOX aplicado a sobrevivência de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta durante 48h à mistura de Cádmio e Clorpirifós

	Adição da concentração				**Ação independente**			
	CA	**S/A**	**DR**	**DL**	**IA**	**S/A**	**DR**	**DL**
Máx	0,87716	0,878644	0,877559	0,87368097	0,933332	0,926927	0,90191	**0,91798409**
β Cádmio	675,1329	675,5424	0,877559	0,87368097	15,785441	15,99568	16,73637	**13,151 1971**
β Clorpirifós	0,883694	0,853321	0,866917	0,92413935	1,193351	1,206108	1,900078	**0,7578 0869**
CE50 Cádmio	59,94067	59,94214	59,93951	59,939293	53,46715	54,10013	55,66099	**55,320 0355**
CE50 Clorpirifós	0,183186	0,186421	0,185933	0,17999052	0,065613	0,076797	0,07275	**0,0987 0014**
a	-	0,012489	0,080066	0,19718921	-	0,820749	3,811239	**4,6674 6271**
b DL/DR	-	-	0,093734	0,71110477	-	-	9,574916	**2,3559 3559**
SS	56,03154	55,97436	55,82842	55,4022819	50,06091	48,889	45,54249	**43,058 0356**
r^2	0,872144228	0,872275	0,872608	0,8735801	0,885768336	0,888442	0,896079	**0,9017 4786**
χ^2 ou teste F	382,2086482	-	-	-	388,1792797	-	-	**-**
df	-	1	2	2	-	1	2	**2**
p (χ^2/F)	1,94081e-81	0,811016	0,903427	0,73006066	9,95806E-83	0,279011	0,104433	**0,0301 5408**

CAPÍTULO 3- Efeitos da toxicidade crônica do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio sobre os cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia rigaudi*

Resumo

Este estudo avaliou a toxicidade crônica do agrotóxico Clorpirifós e do metal Cádmio para as espécies *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia rigaudi*, ambos cladóceros de regiões tropicais. Os *enpoints* analisados foram a sobrevivência, a reprodução, o tamanho dos neonatos produzidos e o crescimento do organismo. A reprodução de ambas as espécies expostas ao Clorpirifós foi afetada em todas as concentrações testadas (0,0014; 0,0028; 0,0042; 0,0056; 0,007 e 0,014 µg L^{-1}). A exposição ao Cádmio afetou a reprodução de *C. rigaudi* em todas as concentrações testadas (0,001; 0,003; 0,005; 0,011; 0,016; 0,022 mg L^{-1}) e *de C. silvestrii* em 0,002; 0,003; 0,005; 0,008 e 0,011 mg L^{-1}. O tamanho dos neonatos produzidos por *C. rigaudi* e C. *silvestrii* expostas ao Clorpirifós foram afetadas em todas as concentrações testadas. A exposição ao Cádmio afetou o tamanho dos neonatos de *C. rigaudi* nas concentrações 0,002; 0,005; 0,008 e 0,011 mg L^{-1} e de *C. silvestrii* em 0,005; 0,011; 0,016 e 0,022 mg L^{-1}. O crescimento de *C. rigaudi* exposta ao Clorpirifós foi afetado nas concentrações 0,0070 e 0,0140 µg L^{-1} e de *C. silvestrii* em 0,0014; 0,0042; 0,005; 0,0070 e 0,0140 µg L^{-1}. A exposição ao Cádmio afetou o crescimento de *C. rigaudi* em 0,002; 0,005; 0,008 e 0,011 mg L^{-1} e de *C. silvestrii* em 0,011; 0,016 e 0,022 mg L^{-1}.

Palavras-chave: Efeitos subletais; Cladóceros; Reprodução; Crescimento.

1. Introdução

A preocupação atual da humanidade se deve ao impacto decorrente do aumento constante de atividades humanas nos ambientes naturais. Nos ecossistemas aquáticos, dentre as principais fontes de contaminação antrópica estão a poluição industrial, urbana, agropecuária e a mineração (QUEIROZ; SILVA; TRIVINHO-STRIXINO, 2008).

O uso de agrotóxicos pode resultar na contaminação de ambientes aquáticos por meio resíduos de sistemas agrícolas, aplicações aérea, externa e interna, erosão do solo e consequente transferência de agrotóxicos adsorvidos ao mesmo, queda de poeira carregando resíduos adsorvidos, chuvas levando ao escoamento dos agrotóxicos e poluição do ar devido à alta volatilidade dos mesmos (EL-NAHHAL; EL-NAHHAL, 2021). O Clorpirifós é um dos inseticidas mais utilizados no mundo (RICO et al., 2021), apesar de já ter sido banido na União Europeia e nos Estados Unidos (VILLAR; SCHAEFFER, 2022b). O composto é um inibidor de acetilcolinesterase (ZHAO; DOURSON; GADAGBUI, 2006) muito utilizado devido a sua eficácia contra coleópteros, dípteros e ortópteros em videiras, frutas cítricas e árvores frutíferas (MAPAMA, 2019).

A mineração, a poluição industrial e urbana são fontes antropogênicas de contaminação dos ambientes aquáticos por metais potencialmente tóxicos (GAUTAM et al., 2014). Entre os metais, o Cádmio é particularmente preocupante por não ser essencial para os sistemas biológicos, podendo ser altamente tóxico mesmo em baixas concentrações (GAUTAM et al., 2014). A toxicidade do cádmio está relacionada a diminuição na atividade de enzimas antioxidantes como glutationa peroxidase, catalase e superóxido dismutase (WAISBERG et al., 2003), além de diminuir a atividade alimentar, podendo comprometer a reprodução e o crescimento dos organismos (BARATA; BAIRD, 2000). O composto é utilizado em aplicações industriais como pigmentos, estabilizantes, revestimentos e ligas (HAYAT et al., 2019).

Avaliar os efeitos tóxicos ao longo do tempo é de extrema importância, uma vez que os efeitos variam com o tempo e entre produtos químicos diferentes, o que pode ser explicado pelo tempo que o organismo leva para acumular resíduos no corpo, em função do tempo de absorção e de eliminação (BAAS; JAGER; KOOIJMAN, 2010). Considerando que o fator temporal desempenha um papel crucial na toxicidade, é amplamente reconhecido que a

duração da exposição de um organismo a um determinado produto químico está diretamente relacionada à magnitude da resposta observada (CAMPBELL et al., 2022).

Tradicionalmente, mensura-se a toxicidade dos agrotóxicos para artrópodes por meio da determinação dos efeitos agudos (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007). Porém, a estimativa letal pode ser apenas uma medida parcial dos efeitos deletérios, uma vez que os efeitos subletais – efeitos fisiológicos ou comportamentais em indivíduos que sobrevivem à exposição a um agrotóxico, devem ser considerados para uma análise completa de seus impactos (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

A espécie de cladócero *Daphnia magna* é a espécie mais utilizada como organismo-teste em protocolos internacionais de qualidade de água (ARIAS; BONETTO; MUGNI, 2020), porém essa espécie não ocorre naturalmente em regiões tropicais (HEBERT, 1978). Por outro lado, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia rigaudi* ocorrem e já foram utilizadas por exemplo em avaliações de toxicidade de fármacos (OLIVEIRA et al., 2018), agrotóxicos (MANSANO et al., 2017) e metais (MOHAMMED, 2007). Ao optar por utilizar organismos nativos, temos as vantagens como evitar a introdução de espécies exóticas no ambiente, facilitar a logística (FREITAS; ROCHA, 2011) e propiciar uma avaliação mais realista sobre a sensibilidade das espécies locais (KRULL; BARROS, 2012).

Portanto, esse trabalho buscou determinar os efeitos na mortalidade, reprodução, crescimento e no tamanho dos neonatos produzidos das espécies *C. silvestrii* e C. *rigaudi* causados por exposição ao agrotóxico Clorpirifós e ao metal Cádmio.

2. Metodologia

2.1 Cultivo e manutenção dos organismos-teste

As espécies *Ceriodaphnia rigaudi*, Richard, 1894 (Crustacea, Cladocera, Daphnidae) e *Ceriodaphnia silvestrii*, Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera, Daphnidae) foram coletados na Represa do Broa, situada entre os municípios de Itirapina - SP e Brotas - SP. Após a coleta, os organismos foram aclimatados e mantidos de acordo com os procedimentos estabelecidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2017), em béqueres de 2 L, contendo

água reconstituída composta por 1,5 g L^{-1} de CaSO4.2H20; 6,1 g L^{-1} de MgSO4.7H2O, 4,8 g L^{-1} de NaHCO3 e 0,2 g L^{-1} de KCl, todos dissolvidos em água destilada. A água reconstituída foi mantida em dureza total entre 40 e 48 mg CaCO3 L^{-1}, pH variando entre 7 e 7,6 e condutividade em torno de 160 µS cm^{-1}. Adicionalmente, foi acrescentada uma gota de vitamina Potemin® a cada litro de água reconstituída.

A renovação do meio de cultivo foi efetuada três vezes por semana, sendo duas renovações completas e uma parcial. Os béqueres foram devidamente cobertos com filme plástico e mantidos a uma temperatura constante de 25 ± 1° C, com fotoperíodo de 12:12 horas claro/escuro.

A dieta dos organismos consistiu em uma suspensão algal da microclorofícea *Raphidocelis subcapitata*, cultivada em meio CHU-12, na concentração de 10^5 células por litro. Adicionalmente, foi fornecido 1 mL L^{-1} de um aditivo alimentar composto por partes iguais de ração fermentada de peixe (TetraMin®) e leveduras (fermento biológico seco tipo Fleischmann® e água destilada).

2.2 Compostos químicos utilizados

Os compostos utilizados nesse estudo foram o Cloreto de Cádmio Monohidratado puríssimo ($CdCl_2.H_2O$, CAS: 7790-78-5) da marca Vetec (grau de pureza 99%), e o agrotóxico Clorpirifós ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, CAS: 2921-88-2) da marca Sigma Aldrich (grau de pureza 98%).

Para o teste com o Cádmio foi preparada uma solução estoque de 10 mg L^{-1}. A partir dessa solução, para *C. rigaudi* foram preparadas seis concentrações por meio de diluições em série em água reconstituída: 0,002; 0,003; 0,005; 0,010; 0,015 e 0,020 mg L^{-1}, além do controle. Para *C. silvestrii* as concentrações, também preparadas a partir da solução de 10 mg L^{-1}, foram de 0,002; 0,005; 0,010; 0,015 e 0,020 mg L^{-1}, além do controle.

A quantificação do Cádmio seguiu as diretrizes estabelecidas na 23ª edição do Standard Methods (SMWW, 3111 B). Uma alíquota da solução estoque foi retirada, acidificada com ácido nítrico concentrado até atingir um pH inferior a 2,0 e, posteriormente, utilizada para a determinação das concentrações reais do elemento. Essas análises foram conduzidas por meio de um Espectrômetro de

Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES Optima 8300/Perkin Elmer).

Para o teste com Clorpirifós foi preparada uma solução-estoque de 1 mg L^{-1}. A partir dessa solução foram preparadas seis concentrações por meio de diluições em série em água reconstituída (0,001; 0,002; 0,003; 0,004; 0,005 e 0,01 µg L^{-1}), além do controle. Para *C. silvestrii,* as concentrações, também preparadas a partir da solução de 1 µg L^{-1}, foram de 0,001; 0,002; 0,003; 0,004; 0,005 e 0,010 µg L^{-1}, além do controle.

A quantificação do Clorpirifós foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV (HPLC-UV). Para tanto, uma alíquota da solução estoque foi retirada e armazenada sob refrigeração até o momento da análise. A avaliação foi conduzida utilizando o equipamento HPLC Agilent 1260 Infinity II, acoplado ao detector UV-Vis, operando a 210 nm e empregando uma coluna Phenomenex Kinetex (5µ, EVO C18, 100Ä, 150 x 4,6 mm). O sistema utilizou uma fase móvel composta por água (A) e acetonitrila (B), no modo isocrático a 30% A / 70% B, com uma vazão de fase móvel de 0,8 mL min^{-1}. O volume de injeção foi de 10 µL, e a temperatura da coluna foi mantida a 40ºC para assegurar as condições ideais de análise.

2.3 Testes de toxicidade crônica

Os testes de toxicidade crônica foram feitos segundo os protocolos da ABNT NBR 13373 (ABNT, 2017). Os testes foram semi-estáticos (com renovação do meio em dias alternados), com duração de 7 dias.

As neonatas com 6h a 24h de idade foram dispostas em recipientes plásticos contendo 15 mL de solução-teste ou água reconstituída no caso do controle, utilizando-se 1 organismo por réplica. Para cada concentração foram feitas 10 réplicas. Os recipientes foram mantidos sem aeração, com alimentação a cada troca de solução, em incubadora com fotoperíodo de 12:12 horas claro/escuro e temperatura controlada de 25 ± 1º C. A alimentação foi realizada com suspensão algal de *Raphidocelis subcapitata* na concentração de 10^5 células por litro e 1 mL de aditivo alimentar para cada 1 L. As variáveis pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido foram medidas no início, a cada troca e ao final de cada experimento. A dureza foi medida somente no início.

Os indivíduos foram observados diariamente e foram registradas a mortalidade, a quantidade e o tamanho dos neonatos produzidos. No início e ao final do teste foi medido o tamanho de cada organismo-teste.

2.4 Análise de dados

As análises foram realizadas a partir de três ensaios. Os valores de CE10, CE20 e seus intervalos de confiança de 95% foram calculados por regressão não linear, ajustando-se uma equação logística aos dados no software Statistica 12.5 (STATSOFT, 2014).

Os dados relativos aos parâmetros reprodutivos e de crescimento foram analisados utilizando-se o *software* SigmaPlot 11 (SYSTAT 2008). A normalidade, a homogeneidade dos dados e a diferença entre os tratamentos foram avaliados pelos testes de Shappiro-Wilk, Levene e análise de variância (ANOVA) respectivamente. Quando os dados atendiam a normalidade e homoscedasticidade foi aplicado o teste de Dunnet. Quando não atendiam foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskall-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Para todas as análises, foi adotado um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

Durante os testes, os parâmetros físicos e químicos foram monitorados e variaram entre pH 7,19 e 8,15, condutividade elétrica entre 147 e 226 µS cm^{-1}, oxigênio dissolvido 7,06 a 8,34 mg L^{-1} e dureza 40 a 44.

A quantificação do Cádmio na solução estoque evidenciou que a concentração se manteve dentro de uma variação de 10% em relação à concentração desejada (Apêndice A), conforme preconizado pela norma ISO 10706:2000 (ISO, 2000), consistência que reforça a segurança na utilização das concentrações nominais. A quantificação do Clorpirifós ultrapassou os 10% (Apêndice B) e, portanto, foram utilizadas as concentrações reais, quantificadas, do produto.

Os resultados dos testes são apresentados como box-plots. Para ambas as espécies, os testes de toxicidade com os compostos evidenciaram diferenças significativas em relação ao controle em todos os *endpoints* analisados.

No caso da reprodução (Fig 1), o número de neonatos produzidos por *C. rigaudi* exposta ao Cádmio (Fig 1A) e ao Clorpirifós (Fig 1C) evidenciou diferença significativa em relação ao controle em todas as concentrações testadas. No caso da reprodução de *C. silvestrii* exposta ao Cádmio (Fig 1B), com exceção da concentração 0,001 mg L^{-1}, houve diferença em todas as outras concentrações. Já para *C. silvestrii* exposta ao Clorpirifós (Fig 1D) também ocorreram diferenças em todas as concentrações testadas.

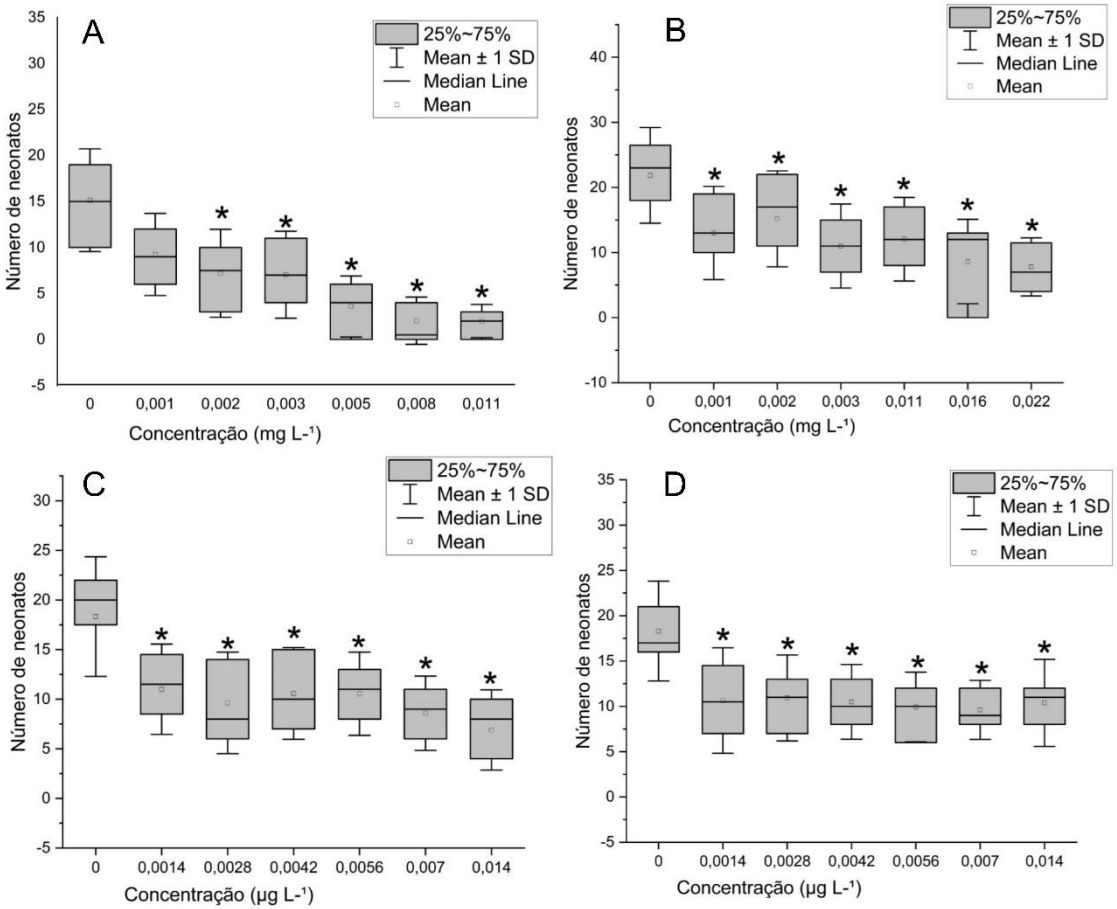


Fig 1 Número médio de neonatos produzidos por fêmea. A) *Ceriodaphnia rigaudi* exposta ao Cádmio; B) *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao Cádmio; C) *Ceriodaphnia rigaudi* exposta ao Clorpirifós; D) *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao Clorpirifós. O asterisco (*) representa valores com diferenças significativas em comparação ao controle (p≤0,05).

Em relação ao crescimento do organismo inicial (Fig 2), para *C. rigaudi* exposta ao Cádmio (Fig 2A) houve diferença em relação ao controle nas concentrações 0,002, 0,005, 0,008 e 0,011 mg L^{-1}, enquanto a exposição da espécie ao Clorpirifós (Fig 2C) evidenciou diferenças nas concentrações 0,007 e 0,014 µg L^{-1}. Para *C. silvestrii*, a exposição ao Cádmio (Fig 2B) resultou em

diferenças nas concentrações 0,011, 0,016 e 0,022 mg L^{-1}, enquanto a exposição ao Clorpirifós (Fig 2D) resultou em diferenças nas concentrações 0,0014, 0,0042, 0,0056, 0,007 e 0,014 µg L^{-1}.

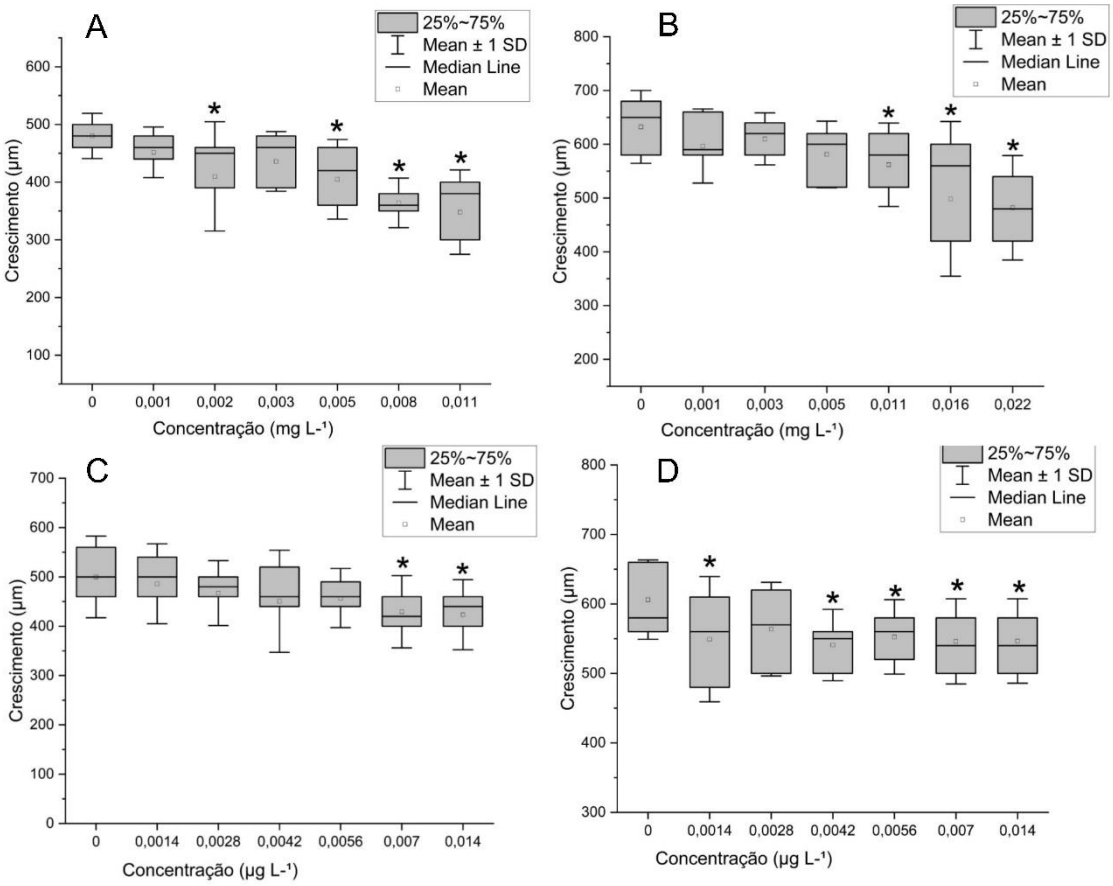


Fig 2 Crescimento médio dos organismos iniciais. A) *Ceriodaphnia rigaudi* exposta ao Cádmio; B) *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao Cádmio; C) *Ceriodaphnia rigaudi* exposta ao Clorpirifós; D) *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao Clorpirifós. O asterisco (*) representa valores com diferenças significativas em comparação ao controle (p≤0,05).

Quanto ao tamanho médio dos neonatos produzidos por fêmea (Fig 3), a exposição de *C. rigaudi* ao Cádmio (Fig 3A) resultou em diferenças em relação ao controle nas concentrações 0,002, 0,005, 0,008 e 0,011 mg L^{-1}, enquanto sua exposição ao Clorpirifós (Fig 3C) resultou em diferenças em todas as concentrações testadas. Para *C. silvestrii* exposta ao Cádmio (Fig 3B) houve diferença nas concentrações 0,005, 0,011, 0,016 e 0,022 mg L^{-1}, enquanto sua exposição ao Clorpirifós (Fig 3D) resultou em diferenças significativas em todas as concentrações testadas.

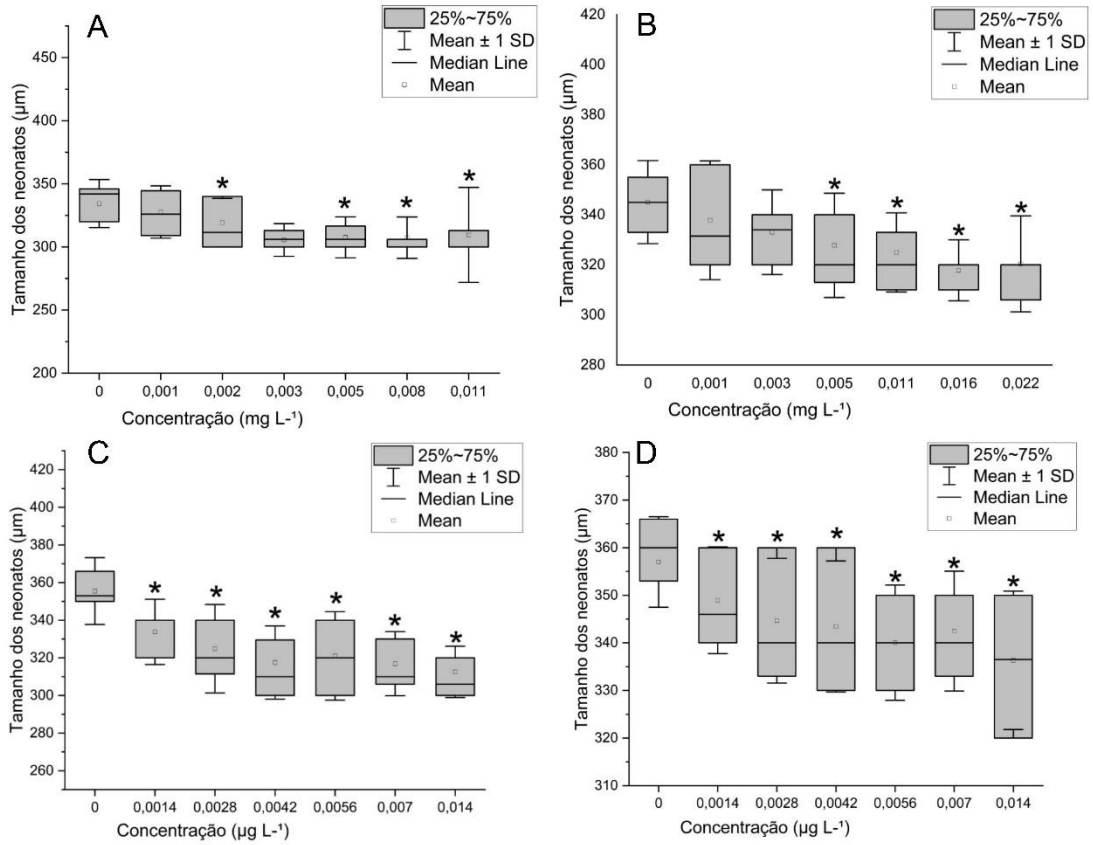


Fig 3 Tamanho médio dos neonatos produzidos por fêmea. A) *Ceriodaphnia rigaudi* exposta ao Cádmio; B) *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao Cádmio; C) *Ceriodaphnia rigaudi* exposta ao Clorpirifós; D) *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao Clorpirifós. O asterisco (*) representa valores com diferenças significativas em comparação ao controle (p≤0,05).

No que se refere à imobilidade, os valores de CE10 e CE20 para ambas as espécies são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de CE10 e CE20 obtidos para *Ceriodaphnia rigaudi* e *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao Cádmio e ao Clorpirifós.

Espécie	Composto	CE10	CE20
C. rigaudi	Cádmio	0,0070 mg L^{-1}	0,0091 mg L^{-1}
C. rigaudi	Clorpirifós	-	0,0018 µg L^{-1}
C. silvestrii	Cádmio	0,0004 mg L^{-1}	0,0052 mg L^{-1}
C. silvestrii	Clorpirifós	0,0040 µg L^{-1}	0,0092 µg L^{-1}

4. Discussão

No presente estudo, os ensaios crônicos resultaram em efeitos prejudiciais tanto para *C. rigaudi* quanto para *C. silvestrii,* em diferentes concentrações para os dois compostos avaliados. Para ambas as espécies, as respostas em nível crônico revelaram inibições da reprodução, redução do tamanho dos neonatos produzidos e no crescimento. Uma hipótese levantada por (SILVA et al., 2020) para a inibição da reprodução de *C. silvestrii* exposta aos agrotóxicos 2,4-D e Fipronil, também se encaixa aos observados no presente trabalho, a de que o estresse causado pelos produtos químicos afeta a alocação de energia predominantemente para a sobrevivência, dessa forma prejudicando as demais funções.

A redução da reprodução é um *endpoint* bastante preocupante, uma vez que pode contribuir para o desaparecimento da espécie. No presente estudo, houve redução significativa da reprodução de *C. rigaudi* e *C. silvestrii* expostas ao Clorpirifós a partir da concentração de 0,0014 µg L^{-1}. Isto evidencia uma maior sensibilidade quando comparada a *C. dubia* (espécie alóctone) que após exposição ao Clorpirifós em água preparada em laboratório, teve LC50 de 0,024 µg L^{-1} e redução da reprodução em 0,022 µg L^{-1} (DEANOVIC et al., 2013).

O Clorpirifós afetou os *endpoints* de maneira diferente. Para *C. rigaudi* o crescimento do organismo inicial foi afetado somente nas maiores concentrações, enquanto a reprodução e tamanho dos neonatos foram afetados em todas as concentrações testadas, fato similar ao reportado por (BAAS; JAGER; KOOIJMAN, 2010), que verificaram que para *endpoints* subletais o curso do tempo é menos direto que para os letais, uma vez que não se relata a resposta em fração (como a % de organismos vivos ou mortos), mas em grau de resposta (como tamanho e reprodução), o que pode mostrar efeitos distintos e até mesmo opostos quando traçados em relação ao tempo.

Nos experimentos realizados por (VAN LEEUWEN; LUTTMER; GRIFFIOEN, 1985) com *Daphnia magna* exposta ao Cádmio, houve também o aumento da mortalidade ao longo do tempo de exposição (20 dias) na concentração de 1,6 µg L^{-1}, e redução da reprodução com inibição completa em concentrações superiores a 3,2 µg L^{-1}. (ELNABARAWY; WELTER; ROBIDEAU, 1986)

expuseram *Daphnia magna* (14 dias)*, Daphnia pulex* (14 dias) e *Ceriodaphnia reticulata* (7 dias) ao Cádmio, tendo observado redução da reprodução a partir de 0,75 µg L^{-1} para *C. reticulata*, 7,5 µg L^{-1} para *D. pulex* e 25 µg L^{-1} para *D. magna*.

Daphnia carinata, uma espécie nativa australiana, assim como observado nos nossos resultados com as espécies nativas, teve sua reprodução afetada desde a menor concentração de Clorpirifós testada por Zalizniak & Nugegoda (2006) (0,005 µg L^{-1}). A diminuição da reprodução de cladóceros expostos a outros agrotóxicos organofosforados também já foi relatada por exemplo no estudo de (WANG et al., 2008), que expôs *D. magna* ao agrotóxico Monotocrofos resultando em diminuição da reprodução a partir da concentração de 10 µg L^{-1}.

No presente estudo, para *C. rigaudi* observamos que o Clorpirifós afetou a reprodução e o tamanho dos neonatos em todas as concentrações, mas o crescimento dos neonatos foi afetado somente pelas duas maiores concentrações. Uma hipótese para explicar esse comportamento é que a energia é alocada primeiramente para o crescimento do organismo, para que futuramente o mesmo invista mais em reprodução. De acordo com a previsão de (LYNCH, 1977), é vantajosa a alocação de energia para o crescimento e sobrevivência quando a fecundidade futura é suficientemente aumentada.

Ambos os cladóceros analisados neste estudo tiveram o tamanho dos neonatos produzidos afetados pelos compostos. Na maioria dos cladóceros planctônicos, o tamanho da prole está positivamente relacionado com o tamanho da mãe, porém quando há uma grande sobreposição nos seus recursos, as mães podem avaliar as condições que seus os filhotes encontrarão e ajustar o tamanho da prole de acordo com sua própria disponibilidade de recursos (BOERSMA, 1997).

Através deste estudo, conseguimos adquirir dados ecológicos significativos ao combinar observações de mortalidade, restrição no crescimento, redução na reprodução e no tamanho dos neonatos. Estes efeitos estão interligados a mecanismos estruturais e funcionais de grande importância para os cladóceros, os quais desempenham um papel fundamental na cadeia alimentar.

5. Conclusões

No presente trabalho, tanto o Cádmio quanto o Clorpirifós causaram efeitos subletais (diminuição do crescimento, da reprodução e do tamanho dos neonatos gerados) nos cladóceros *C. rigaudi* e *C. silvestrii*.

Dessa forma, a utilização de respostas subletais implementadas para avaliar os efeitos crônicos da toxicidade, como a diminuição do crescimento, redução da reprodução e do tamanho de neonatos revelaram-se sensíveis e apropriados para evidenciar a magnitude dos potenciais impactos dos metais e agrotóxicos sobre organismos aquáticos não-alvo.

Referências

ABNT, Associação Brasileira De Normas Técnicas. **NBR 13373: Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera).**, 2017.

ARIAS, M.; BONETTO, C.; MUGNI, H. Sublethal effects on Simocephalus vetulus (Cladocera: Daphnidae) of pulse exposures of cypermethrin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 196, p. 110546, jun. 2020.

BAAS, J.; JAGER, T.; KOOIJMAN, B. Understanding toxicity as processes in time. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 18, p. 3735–3739, ago. 2010.

BARATA, C.; BAIRD, D. J. Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with Daphnia magna Straus. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 2–3, p. 195–209, mar. 2000.

BOERSMA, M. Offspring size and parental fitness in Daphnia magna. **Evolutionary Ecology**, v. 11, n. 4, p. 439–450, jul. 1997.

CAMPBELL, P. G. C. et al. Ecotoxicology. [s.l.] **Cambridge University Press**, 2022.

DEANOVIC, L. A. et al. Comparing the effectiveness of chronic water column tests with the crustaceans Hyalella azteca (order: Amphipoda) and Ceriodaphnia dubia (order: Cladocera) in detecting toxicity of current-use insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 3, p. 707–712, 15 mar. 2013.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-M. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. **Annual Review of Entomology,** v. 52, n. 1, p. 81–106, 1 jan. 2007.

ELNABARAWY, M. T.; WELTER, A. N.; ROBIDEAU, R. R. Relative sensitivity of three daphnid species to selected organic and inorganic chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 393–398, abr. 1986.

EL-NAHHAL, I.; EL-NAHHAL, Y. Pesticide residues in drinking water, their potential risk to human health and removal options. **Journal of Environmental Management**, v. 299, p. 113611, dez. 2021.

FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute Toxicity Tests with the Tropical Cladoceran Pseudosida ramosa: The Importance of Using Native Species as Test Organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 241–249, 13 fev. 2011.

GAUTAM, R. K. et al. Contamination of Heavy Metals in Aquatic Media: Transport, Toxicity and Technologies for Remediation. Em: **Heavy Metals In Water**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2014. p. 1–24.

HAYAT, M. T. et al. Environmental Hazards of Cadmium: Past, Present, and Future. Em: Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants. [s.l.] **Elsevier**, 2019. p. 163–183.

HEBERT, P. D. N. The Population Bilogy Of Daphnia (Crustacea, Daphnidae). **Biological Reviews**, v. 53, n. 3, p. 387–426, 21 ago. 1978.

ISO. **Water quality - Determination of long term toxicity of substances to Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)**. ISO 10706:2000, abr. 2000.

KRULL, M.; BARROS, F. Key issues in aquatic ecotoxicology in Brazil: a critical review. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 2, 2012.

LYNCH, M. Fitness and Optimal Body Size in Zooplankton Population. **Ecology,** v. 58, n. 4, p. 763–774, jul. 1977.

MANSANO, A. S. et al. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae Raphidocelis subcapitata. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 312–321, ago. 2017.

MAPAMA. **Registration of Phytosanitary Products in Spain**. 2019.

MOHAMMED, A. Comparative sensitivities of the tropical cladoceran, Ceriodaphnia rigaudii and the temperate species Daphnia magna to seven toxicants. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 347–352, abr. 2007.

OLIVEIRA, L. L. D. DE et al. Acute and Chronic Effects of Three Pharmaceutical Drugs on the Tropical Freshwater Cladoceran Ceriodaphnia silvestrii. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 4, p. 116, 15 abr. 2018.

QUEIROZ, J. F. DE; SILVA, M. S. G. M. E; TRIVINHO-STRIXINO, S. Ecossistemas Aquáticos e seu Manejo. Em: QUEIROZ, J. F. DE; SILVA, M. S. G. M. E; TRIVINHO-STRIXINO, S. (Eds.). **Organismos bentônicos: biomonitoramento de qualidade de águas.** Jaguariuna: Embrapa, 2008. p. 8–24.

RICO, A. et al. Use of Postregistration Monitoring Data to Evaluate the Ecotoxicological Risks of Pesticides to Surface Waters: A Case Study with Chlorpyrifos in the Iberian Peninsula. **Environmental Toxicology and Chemistry,** v. 40, n. 2, p. 500–512, 22 fev. 2021.

SILVA, L. C. M. et al. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran Ceriodaphnia silvestrii. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 9, p. 1462–1475, 29 nov. 2020.

VAN LEEUWEN, C. J.; LUTTMER, W. J.; GRIFFIOEN, P. S. The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with Daphnia magna: A cadmium example. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 9, n. 1, p. 26–39, fev. 1985.

VILLAR, D.; SCHAEFFER, D. J. Chlorpyrifos should be banned in agriculture and livestock production in Colombia. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 35, n. 2, p. 61–67, 5 abr. 2022.

WAISBERG, M. et al. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology**, v. 192, n. 2–3, p. 95–117, nov. 2003.

WANG, L. et al. Acute and chronic toxicity of organophosphate monocrotophos to Daphnia magna. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 44, n. 1, p. 38–43, 24 dez. 2008.

ZALIZNIAK, L.; NUGEGODA, D. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of Daphnia carinata. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 207–214, jun. 2006.

ZHAO, Q.; DOURSON, M.; GADAGBUI, B. A review of the reference dose for chlorpyrifos. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 111–124, mar. 2006.

Apêndices

Apêndice A – Quantificação do Cádmio

Tabela 1. Resultados e parâmetros de quantificação para Cádmio.

Parâmetro	Valor nominal (mg L^{-1})	Valor quantificado (mg L^{-1})	Limite de detecção	Método referência
Cádmio	5,58	6,69±0,0018	0,0006	SMWW 3111 B

Apêndice B – Quantificação do Clorpirifós

Tabela 2. Resultados e parâmetros de quantificação para Clorpirifós.

Parâmetro	Valor nominal (mg L^{-1})	Valor quantificado (mg L^{-1})	Limite de detecção (mg L^{-1})	Limite de quantificação (mg L^{-1})
Clorpirifós	1	1,445±0,186	0,004	0,015

CAPÍTULO 4 - Efeitos da Exposição Crônica de *Moina micrura* ao Clorpirifós em Diferentes Vias de Exposição

RESUMO

Os agrotóxicos representam um risco ao ecossistema impactando não apenas os organismos-alvo, mas também outros que entram em contato com o composto pelo ambiente ou cadeia alimentar. Apesar de banido em diversos países, o Clorpirifós continua sendo amplamente utilizado em países em desenvolvimento. O objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade do cladócero *Moina micrura* ao inseticida Clorpirifós em diferentes vias de exposição. Para isso, foram conduzidos testes de toxicidade aguda para determinar a sensibilidade a um composto de referência (NaCl) e testes de toxicidade crônica ao Clorpirifós avaliando os parâmetros reprodução, crescimento e atividade alimentar nas diferentes vias: o meio de cultivo (água reconstituída), a alimentação (alga) e ambos. A sensibilidade de *Moina micrura* ao NaCl resultou em uma CE50-48h média de 1,5 g L^{-1}. Os testes de toxicidade crônica revelaram não haver diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle em relação à reprodução, crescimento e atividade alimentar nas concentrações testadas (0,14 e 0,28 µg L^{-1}; CE10 e CE20).

Palavras-chave: Ecotoxicidade; Cladóceros; Dieta; Carta-controle

1. Introdução

Os agrotóxicos são bastante utilizados por livrarem as lavouras, jardins e áreas públicas das pragas, porém seu uso representa um risco ao ecossistema (MOJIRI et al., 2020) uma vez que afeta não apenas os organismos aos quais ele se destina, mas também os que entram em contato direto por meio de seu ambiente ou através da cadeia alimentar (BOUDH; SINGH, 2019).

O Clorpirifós é um agrotóxico da classe dos inseticidas organofosforados que apesar de banido em diversos países continua sendo amplamente utilizado em países em desenvolvimento (FOONG et al., 2020). É um composto que tem sido extensivamente empregado desde sua introdução em 1965, o que está relacionado ao seu baixo custo e à facilidade de acesso, resultando no registro do produto em grande parte das nações ao redor do mundo (JOHN; SHAIKE, 2015). No Brasil, em 2022 foi registrada de 8,8 mil toneladas do ingrediente ativo, ficando em 9º lugar entre os agrotóxicos mais vendidos no país (IBAMA, 2022)

Os usos do Clorpirifós são principalmente na agricultura para o controle de insetos em diversas culturas, como algodão, grãos e frutas, além do uso urbano para manutenção paisagística, controle de pragas e produtos destinados a animais de estimação (BANKS; HUNTER; WACHAL, 2005). A ocorrência desse composto em águas superficiais já foi relatada em diversos países, como no rio Almonda em Portugal na concentração de 0,033 mg L^{-1} (SILVA; CEREJEIRA, 2012), nos rios de Baitkamari e Pirijpur em Bangladesh na concentração de 0,009 mg L^{-1} (SUMON et al., 2018) e no rio Volturno na Itália na concentração de 0,0054 mg L-1 (TRIASSI et al., 2019). No Brasil, a ocorrência já foi relatada nos Estados de São Paulo – rio Ribeirão Preto na concentração de 0,36 µg L^{-1} (CETESB, 2021), Mato Grosso – na Bacia do Pantanal na concentração de 0,003 µg L^{-1} (LAABS et al., 2002) e no Rio Grande do Sul – na Bacia do Jacuí na concentração de 0,13 µg L^{-1} (SEQUINATTO et al., 2013), na Bacia Nova Boemia na concentração de 0,19 µg L^{-1} e na Bacia de Candido Brum na concentração de 0,29 µg L^{-1} (BORTOLUZZI et al., 2007).

Devido à estrutura e às propriedades físicas e químicas do Clorpirifós, que é um composto apolar, este apresenta baixa solubilidade em água e tendência para se distribuir preferencialmente de ambientes aquosos para solventes orgânicos (JOHN; SHAIKE, 2015). Além disso, o Clorpirifós adsorve ao solo, matéria orgânica, minerais argilosos e sedimentos em variados graus (GEBREMARIAM et al., 2012). Daam et al. (2008) observaram que na ausência de macrófitas, a alta biomassa de algas nos sistemas de teste dominados por plâncton provavelmente reteve uma grande parte da dose de Clorpirifós aplicada.

Os testes ecotoxicológicos geralmente avaliam a exposição dos contaminantes dissolvidos no meio, porém a biota aquática pode acumular substâncias tóxicas dissolvidas na água ou associadas à dieta (SOFYAN; SHAW; BIRGE, 2006). Além disso, as regulamentações ambientais raramente consideram a exposição via dieta (WILDING; MALTBY, 2006). Porém, efeitos letais e subletais de organismos expostos a contaminantes através da alimentação já foram observados em alguns trabalhos, como o de (SOFYAN; SHAW; BIRGE, 2006) que avaliaram a sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia* após receber uma dieta de *Pseudokirchneriella subcapitata* exposta ao Cádmio e ao Cobre e observaram efeitos deletérios na taxa de alimentação, na

sobrevivência e na reprodução da mesma. (WILDING; MALTBY, 2006) avaliaram a sensibilidade de *Gammarus pulex* ao Zinco através da dieta, da água e de ambos, tendo observado maior mortalidade e menor taxa de alimentação no tratamento em que ambas as vias foram contaminadas. (GEFFARD et al., 2008) avaliaram a sensibilidade de *Daphnia magna* ao Cádmio exposto via alimentação e água, obtendo resultados deletérios para reprodução e efeitos aditivos quando houve exposição em ambas as vias.

Os cladóceros são amplamente utilizados como organismos-teste devido a sua sensibilidade a muitas substâncias, pequeno tamanho, ampla distribuição reprodução partenogênica, alta densidade e rápido crescimento populacional (COSTA et al., 2008; SARMA; NANDINI, 2006). Entretanto, a maioria dos ensaios é realizado com espécies de regiões temperadas, como *Daphnia magna,* o que vem sendo discutido devido a sua ocorrência natural restrita a essas regiões (SARMA; NANDINI, 2006). Nesse sentido, a utilização de espécies nativas pode aumentar a representatividade do estudo, além de evitar a introdução acidental de espécies não-nativas na região (KRULL & BARROS, 2012).

Posto isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade da espécie de cladócero *Moina micrura* ao inseticida Clorpirifós através de testes de toxicidade crônica em diferentes vias de exposição: o meio (água reconstituída), a alimentação (alga) e ambas. Os parâmetros avaliados foram a reprodução, o crescimento e atividade alimentar.

2. Metodologia

2.1 Cultivo e manutenção dos organismos-teste

Os cladóceros foram coletados na Represa do Broa, localizada entre os municípios de Itirapina - SP e Brotas - SP. Após a coleta, foram submetidos à aclimatação e mantidos conforme os procedimentos descritos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017), em béqueres de 2L contendo água reconstituída composta de 1,5 g L^{-1} $CaSO_4.2H_20$, 6,1 g L^{-1} $MgSO_4.7H_2O$, 4,8 g L^{-1} $NaHCO_3$ e 0,2 g L^{-1} KCl dissolvidos em água destilada, com dureza total entre 40 e 48 mg $CaCO_3$ L^{-}

^{1}, pH entre 7 e 7,6 e condutividade em torno de 160 µS cm^{-1}. Além disso, foi adicionada 1 gota de vitamina Freshtamin a cada 2 litros de água reconstituída.

A renovação do meio foi realizada três vezes por semana, sendo duas completas e uma parcial. Os béqueres foram cobertos com filme plástico e mantidos em temperatura de 25 ± 1° C e fotoperíodo de 12:12 horas claro/escuro.

A alimentação consistiu de suspensão algal da microclorofícea *Raphidocelis subcapitata* cultivada em meio CHU-12 na concentração de 10^5 células por litro e 1 mL L^{-1} de um aditivo alimentar composto de partes iguais de ração fermentada de peixe (TetraMin®) e leveduras (fermento biológico seco tipo Fleischmann e água destilada).

2.2 Compostos químicos utilizados no estudo

Para o teste de toxicidade crônica, o produto utilizado nesse estudo foi o ingrediente ativo Clorpirifós (C9H11Cl3NO3PS, CAS: 2921-88-2) da marca Sigma Aldrich com grau de pureza 98% e Acetonitrila (C_2H_3N, CAS: 75-05-8) da marca Êxodo Científica para diluição do produto.

Para a realização do teste de toxicidade crônica foi preparada uma solução estoque de 1 mg L^{-1} de Clorpirifós e a partir dessa solução foram feitas as diluições de 0,1 e 0,2 µg L^{-1} em água reconstituída ou alga, conforme tratamento. A quantificação do Clorpirifós foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector UV (HPLC-UV). Uma amostra da solução estoque foi retirada e armazenada refrigerada até o momento da análise. O procedimento foi conduzido utilizando o equipamento HPLC Agilent 1260 Infinity II, em conjunto com o detector UV-Vis, operando a 210 nm e empregando uma coluna Phenomenex Kinetex (5µ, EVO C18, 100Ä, 150 x 4,6 mm). A fase móvel consistiu em Água (A)/Acetonitrila (B) em modo isocrático a 30%A / 70%B, com uma vazão de fase móvel de 0.8 mL min^{-1}, volume de injeção de 10 µL e temperatura da coluna mantida a 40ºC. Após a quantificação, as concentrações nominais foram ajustadas para refletir os valores reais do composto.

Para a determinação da faixa de sensibilidade da espécie foi utilizado o cloreto de sódio (NaCl, CAS: 7647-14-5) da marca Dinâmica Química Contemporânea. A solução estoque foi preparada na concentração de 10 g L^{-1} e a partir dessa solução foram feitas as diluições de 0,6; 1,0; 1,4; 1,8; 2,2; e 2,6 g L^{-1} de em água reconstituída.

2.3 Testes de toxicidade aguda ao composto de referência NaCl

Os testes de toxicidade aguda foram conduzidos seguindo os protocolos da ABNT NBR 12713 (ABNT, 2016). Foram realizados 20 testes visando determinar a faixa de sensibilidade da espécie. A representação gráfica (carta-controle) foi elaborada da seguinte forma: uma linha que representa o valor médio das CE50-48H a partir dos 20 testes realizados e duas linhas que representam os limites superior e inferior do intervalo de confiança de 95%.

Os testes foram conduzidos de forma estática (sem renovação do meio), sem iluminação e em temperatura controlada de 25±1ºC. Para cada concentração testada foram feitas 4 réplicas contendo 5 organismos por réplica em recipientes contendo 15 mL de solução teste. A duração do ensaio foi de 48 horas e ao final foi observado o número de organismos imóveis. As variáveis pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido foram registradas no início e ao término de cada experimento, enquanto a medição da dureza da água foi realizada somente no início.

2.4 Teste de toxicidade crônica ao Clorpirifós

O teste de toxicidade crônica foi conduzido seguindo os protocolos da ABNT NBR 13373 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017) adaptados para a exposição às diferentes vias de exposição. Os testes foram semi-estáticos (com renovação do meio em dias alternados) e com duração de 7 dias.

Os organismos com idades entre 6 e 24 horas foram colocados em recipientes de plástico contendo 15 mL de solução de teste, enquanto no grupo

de controle com a mesma quantidade de água reconstituída. Para cada tratamento foram preparadas 10 réplicas contendo um indivíduo em cada.

Os tratamentos realizados foram (1) o controle, contendo somente o meio de cultivo (água reconstituída); (2) somente meio contaminado com o Clorpirifós; (3) a alga contaminada com o Clorpirifós suspensa em meio; e (4) meio e alga contaminadas com o Clorpirifós. Para cada tratamento, duas concentrações do Clorpirifós foram testadas: 0,14 e 0,28 µg L^{-1}, que representam respectivamente a CE10 e CE20 calculadas com base em testes de toxicidade aguda realizados em estudos anteriores (RAYMUNDO et al., 2019). Para a contaminação do meio, o composto foi adicionado no mesmo dia da montagem do experimento, enquanto para a contaminação da alga, a mesma foi exposta ao clorpirifós 96h antes de serem oferecidas aos cladóceros.

Os recipientes foram mantidos em incubadora com um ciclo de iluminação de 12 horas de luz seguidas por 12 horas sem iluminação, com uma temperatura constante de 25 ± 1º C, sem fornecimento de aeração. A cada dois dias foi feita a substituição da solução, na qual os organismos foram alimentados comsuspensão de *Raphidocelis subcapitata* com densidade de 10^5 células por mL e 1 mL de suplemento alimentar para cada 1,5 litros de solução. As variáveis pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido foram registradas no início, após cada troca de solução e ao término de cada experimento. A medição da dureza da água foi realizada ao início e a cada renovação do meio.

Os organismos foram observados diariamente e foram anotadas a imobilidade e a quantidade de neonatos produzidos. O tamanho do organismo inicial foi medido no início e ao término do teste. Além disso, o número de células de *R. subcapitata* foi estimado para uma réplica de cada tratamento através de contagem utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico Zeiss no aumento de 400x no início, a cada renovação do meio e ao final do experimento.

2.5 Análise de dados

A análise dos testes agudos ao composto de referência, que inclui os valores de CE50-48h e respectivos intervalos de confiança de 95% foram calculados por regressão não linear, ajustando-se uma equação logística aos dados no software Statistica 12.5 (STATSOFT, 2014).

A análise dos parâmetros reprodutivos, imobilidade e crescimento para cada tratamento foram conduzidas utilizando o *software* Jamovi 2.3 (JAMOVI, 2023). A normalidade, a homogeneidade dos dados e as diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por meio dos testes de Shappiro-Wilk, Levene e análise de variância de uma via (ANOVA) respectivamente. Quando os dados atenderam aos critérios de normalidade e homogeneidade, o teste de Dunnet foi aplicado; no caso contrário, quando os dados não atenderam a esses critérios, o teste não paramétrico de Kruskall-Wallis foi empregado. Em todas as análises, um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$) foi adotado.

3. Resultados

3.1 Testes de sensibilidade ao composto de referência

Nos testes de toxicidade aguda com o composto de referência cloreto de sódio, o pH variou entre 7,17 e 8,19, a condutividade elétrica de 126 a 7600 µS cm^{-1}, o oxigênio dissolvido entre 5,02 e 7,53 mg L^{-1} e a dureza entre 40 e 44 mg $CaCO_3$ L^{-1}, atendendo aos critérios de variação estabelecidos pela ABNT (ABNT, 2017).

Os valores de CE50-48h do cloreto de sódio para *Moina micrura* variaram de 1,21 a 2,01 g L^{-1}, com média 1,5 g L^{-1}, desvio padrão 0,2, variância 0,03 e coeficiente de variação 13,54%. Os valores de CE50 para cada um dos testes e seus intervalos de confiança de 95% são apresentados na Tabela 1 (Apêndice A) e a faixa de sensibilidade do organismo pode ser observada na Figura 1.

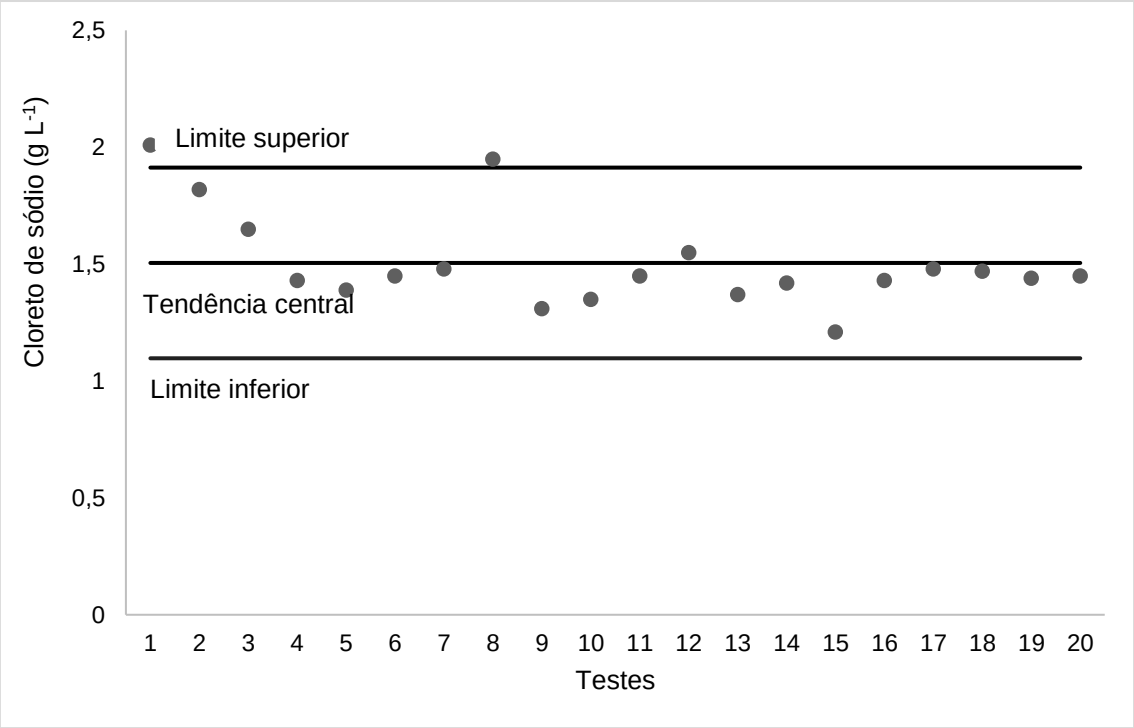


Fig 1. Faixa de sensibilidade de *Moina micrura* ao Cloreto de Sódio (NaCl) em 20 testes de toxicidade aguda (carta-controle).

3.2 Testes de toxicidade crônica ao Clorpirifós

Nos testes de toxicidade crônica com o Clorpirifós em diferentes vias de exposição, o pH variou entre 7,05 e 8,18, a condutividade elétrica de 155 a 343 µS cm^{-1}, o oxigênio dissolvido entre 6,35 e 7,24 mg L^{-1} e a dureza entre 40 e 44 mg $CaCO_3$ L^{-1}, atendendo aos critérios de variação estabelecidos pela ABNT (ABNT, 2017). Os dados relativos à quantificação de Clorpirifós podem ser observados na Tabela 2 (Apêndice B).

Para o *endpoint* reprodução, medido através do número de neonatos produzidos por fêmea (Fig 2) não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$).

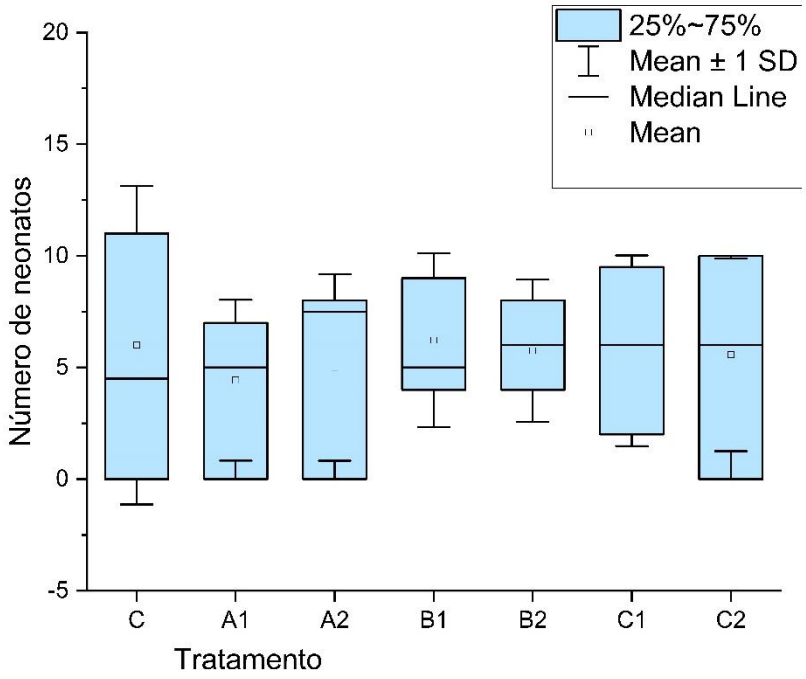


Fig 2 Número médio de neonatos produzidos por fêmea de *Moina micrura* em cada tratamento, sendo: C (Controle), A1 (Água contaminada em 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós), A2 (Água contaminada em 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós), B1 (Alga contaminada em 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós), B2 (Alga contaminada em 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós), C1 (Água e alga contaminadas em 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós) e C2 (Água e alga contaminadas em 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós).

Para o crescimento, medido por meio do tamanho médio por fêmea (Fig 3) também não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$).

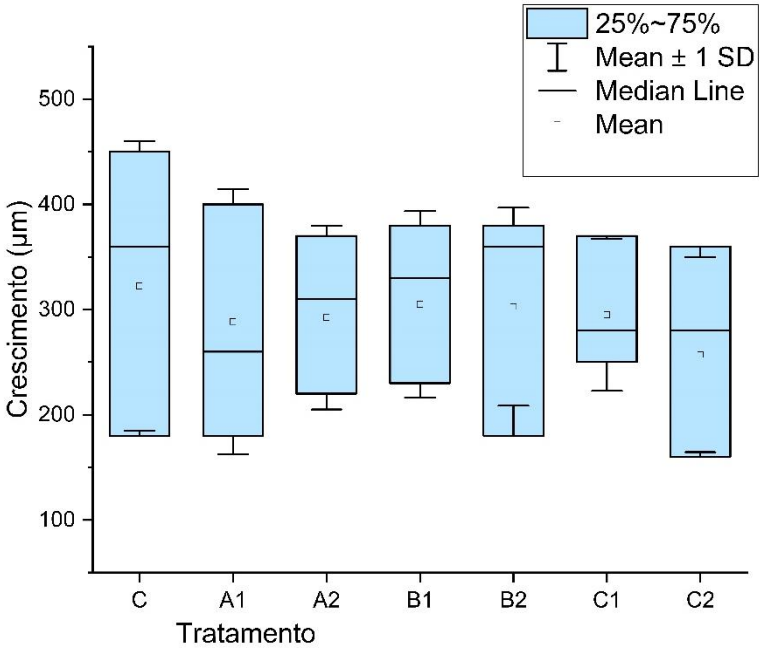


Fig 3 Crescimento médio de indivíduos de *Moina micrura* em cada tratamento, sendo: C (Controle), A1 (Água contaminada em 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós), A2 (Água contaminada em 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós), B1 (Alga contaminada em 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós), B2 (Alga contaminada em 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós), C1 (Água e alga contaminadas em 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós) e C2 (Água e alga contaminadas em 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós).

A atividade alimentar, medida por meio da variação entre a concentração final e inicial de alga a cada renovação do meio (Fig 4) também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$).

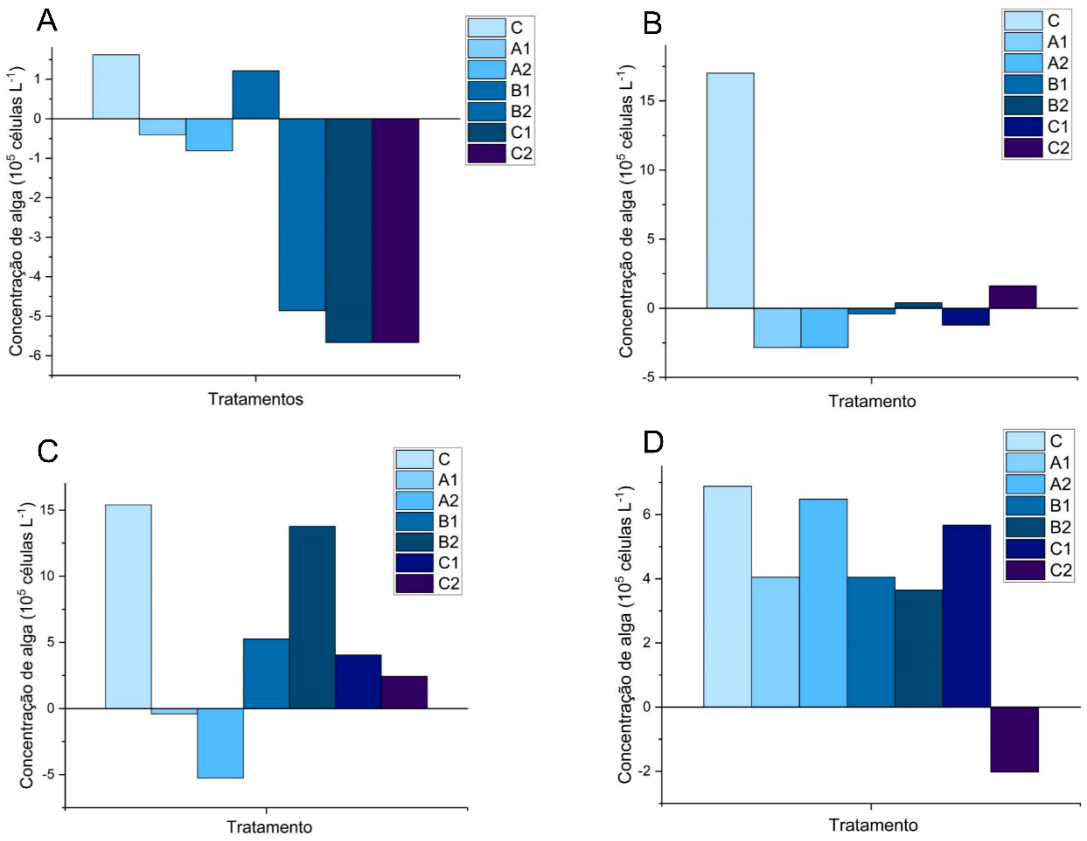


Fig 4 Saldo da Concentração final de alga em cada tratamento nos testes de alimentação com *Moina micrura*. sendo: C (Controle), A1 (Água contaminada em 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós), A2 (Água contaminada em 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós), B1 (Alga contaminada em 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós), B2 (Alga contaminada em 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós), C1 (Água e alga contaminadas em 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós) e C2 (Água e alga contaminadas em 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós). A) 1ª renovação do meio; B) 2ª renovação do meio; C) 3ª renovação do meio; D) 4ª renovação do meio.

O *endpoint* imobilidade (Fig 5) não evidenciou diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$).

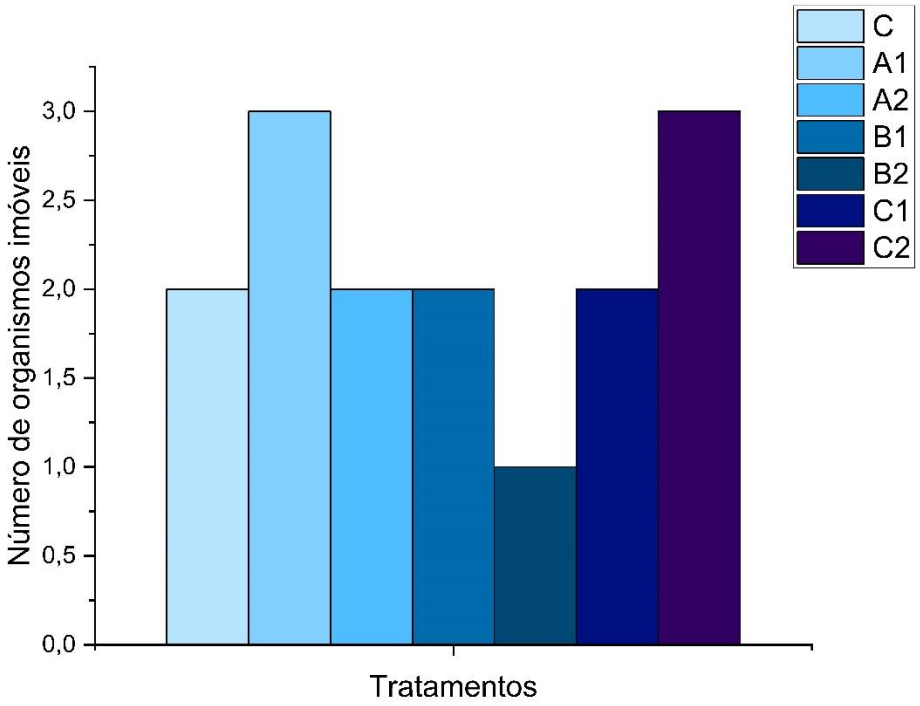


Fig 5 Número de organismos imóveis [1] de indivíduos de *Moina micrura* em cada tratamento. sendo: C (Controle), A1 (Água contaminada com 0,14 µg L^{-} Clorpirifós), A2 (Água contaminada com 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós), B1 (Alga contaminada com 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós), B2 (Alga contaminada com 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós), C1 (Água e alga contaminadas com 0,14 µg L^{-1} de Clorpirifós) e C2 (Água e alga contaminadas com 0,28 µg L^{-1} de Clorpirifós).

Os dados de X^2, graus de liberdade e valores de p para cada *endpoint* analisado podem ser observados na Tabela 3 (Apêndice C).

4. Discussão

Conforme o levantamento bibliográfico feito neste estudo, a sensibilidade de *Moina micrura* ao Cloreto de Sódio foi avaliada por outros pesquisadores apenas uma vez, na qual se obteve uma CE50-48h média de 2,16 g L^{-1} de NaCl (EVANGELISTA, 2018), valor superior ao encontrado neste trabalho (1,5 g L^{-1}). Embora se reconheça existência de variações interlaboratoriais, os intervalos de toxicidade apresentados podem ser considerados valores de referência preliminares para a espécie em questão (ANDRADE, 2020).

Neste trabalho, a toxicidade do Clorpirifós ao cladócero *Moina micrura* exposto via dieta ou meio de cultivo não teve diferença significativa em relação ao controle. O estudo de Bessa da Silva et al., (2016), que expôs o cladócero *Daphnia magna* ao herbicida Pendimethalin por meio da dieta composta de

Raphidocelis subcapitata demonstrou diminuição da reprodução. No entanto, assim como no presente estudo, não foram observadas diferenças em relação ao crescimento do organismo. Além disso, os autores relataram diminuição na qualidade nutricional de *R. subcapitata*, o que em conjunto com a acumulação do herbicida por meio da dieta pode ter contribuído para a diminuição da reprodução.

Martinez et al., (2015) avaliou a exposição da alga *R. subcapitata* ao Clorpirifós, relatando efeitos genotóxicos a partir da concentração de 0,8 mg L^{-1}, na qual a citotoxicidade não foi evidente. Essa concentração é aproximadamente 400 vezes maior que a máxima concentração utilizada no presente estudo, a qual corresponde à CE20 do Clorpirifós para *Moina micrura*.

Outros compostos, como metais, já tiveram sua toxicidade por diferentes vias de contaminação documentadas para cladóceros. Wang et al. (2010) identificaram uma redução na reprodução de *Moina mongolica* alimentada com *Chlorella pyrenoidosa* exposta ao cádmio. Rodgher et al. (2008) observaram redução do número de neonatos produzidos por fêmea, na eclosão de ovos, no tamanho corporal, na taxa de alimentação e na sobrevivência de *Ceriodaphnia silvestrii* com dieta de *R. subcapitata* previamente contaminada com cobre. Contrariamente, Vieira et al. (2023) não identificaram efeitos tóxicos sobre *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao Cromo via dieta, mas constataram um aumento da qualidade nutricional da alga *Chlorella vulgaris*, o que segundo os autores pode estar associado à ausência de efeitos tóxicos, indicando que a melhoria na qualidade nutricional pode ter atenuado a toxicidade (VIEIRA et al., 2023).

Na literatura, são ainda escassos os dados referentes à toxicidade de compostos expostos através da dieta dos organismos. Com o objetivo de realizar avaliações mais realistas dos riscos associados à poluição aquática, torna-se fundamental expandir o conhecimento acerca da toxicidade dos poluentes, considerando diversas vias de exposição e diferentes espécies. Esse enfoque abrangente permitirá uma compreensão mais completa e precisa dos impactos ambientais, contribuindo para uma gestão mais eficaz da qualidade da água e da saúde dos ecossistemas aquáticos.

5. Conclusões

Os testes de toxicidade crônica do Clorpirifós para o cladócero *Moina micrura* por meio de diferentes vias de exposição conduzidos neste estudo não revelaram diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle em relação à reprodução, crescimento e atividade alimentar nas concentrações testadas, rejeitando-se, portanto, a hipótese inicial de que a toxicidade de ambos compostos seria maior quando a via de exposição fosse dupla.

Além disso, este estudo é pioneiro na investigação dos efeitos do agrotóxico Clorpirifós ao cladócero *Moina micrura,* de ampla ocorrência em regiões tropicais por diferentes vias de contaminação. Conclui-se que futuras pesquisas são necessárias para aprofundar a compreensão dos mecanismos subjacentes às vias de toxicidade específicas de agrotóxicos a diferentes espécies, possibilitando uma avaliação de risco ambiental mais realista para produtos químicos em organismos aquáticos.

Referências

ABNT, Associação Brasileira De Normas Técnicas. **NBR 12713: Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)**. 2016.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 13373: Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera).** 2017.

ANDRADE, D. DE P. **Estrutura E Dinâmica Da Recolonização De Invertebrados Aquáticos Em Um Lago Temporário Em Uma Área Preservada De Cerrado E Efeitos De Metais Sobre Algumas Espécies.** Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais)—São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2020.

BANKS, K. E.; HUNTER, D. H.; WACHAL, D. J. Chlorpyrifos in surface waters before and after a federally mandated ban. **Environment International**, v. 31, n. 3, p. 351–356, abr. 2005.

BESSA DA SILVA, M. et al. Effects of dietary exposure to herbicide and of the nutritive quality of contaminated food on the reproductive output of Daphnia magna. **Aquatic Toxicology,** v. 179, p. 1–7, out. 2016.

BORTOLUZZI, E. C. et al. Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1872–1876, 2007.

BOUDH, S.; SINGH, J. S. Pesticide Contamination: Environmental Problems and Remediation Strategies. Em: Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management. Singapore: **Springer Singapore**, 2019. p. 245–269.

CETESB, S. P. **Diagnóstico da contaminação de águas superficiais, subterrâneas e sedimentos por agrotóxicos**. São Paulo: 2021.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

DAAM, M. A. et al. Fate and effects of the insecticide chlorpyrifos in outdoor plankton-dominated microcosms in Thailand. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2530–2538, 9 dez. 2008.

EVANGELISTA, S. DE A. **Implantação em laboratório de cultivos de Moina micrura e Ceriodaphnia cornuta (Cladocera; Crustacea), espécies de cladóceras que ocorrem naturalmente em reservatórios do alto curso do rio Doce, nordeste brasileiro**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciencias Biologicas), Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2018.

FOONG, S. Y. et al. A recent global review of hazardous chlorpyrifos pesticide in fruit and vegetables: Prevalence, remediation and actions needed. **Journal of Hazardous Materials**, v. 400, p. 123006, dez. 2020.

GEBREMARIAM, S. Y. et al. Adsorption and Desorption of Chlorpyrifos to Soils and Sediments. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology,** p. 123–175. 2012.

GEFFARD, O. et al. Effects Of Chronic Dietary And Waterborne Cadmium Exposures On The Contamination Level And Reproduction Of Daphnia Magna. **Environmental Toxicology and Chemistry,** v. 27, n. 5, p. 1128, 2008.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2022.

JAMOVI. **The Jamovi project**. https://www.jamovi.org, 2023.

JOHN, E. M.; SHAIKE, J. M. Chlorpyrifos: pollution and remediation. **Environmental Chemistry Letters**, v. 13, n. 3, p. 269–291, 2 set. 2015.

KRULL, M.; BARROS, F. Key issues in aquatic ecotoxicology in Brazil: a critical review. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 2, 2012.

LAABS, V. et al. Pesticides in Surface Water, Sediment, and Rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. **Journal of Environmental Quality,** v. 31, n. 5, p. 1636–1648, set. 2002.

MARTINEZ, R. S.; DI MARZIO, W. D.; SÁENZ, M. E. Genotoxic effects of commercial formulations of Chlorpyrifos and Tebuconazole on green algae**. Ecotoxicology**, v. 24, n. 1, p. 45–54, 18 jan. 2015.

MOJIRI, A. et al. Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. **Chemosphere,** v. 253, p. 126646, ago. 2020.

RAYMUNDO, L. B. et al. Sensitivity of tropical cladocerans to chlorpyrifos and other insecticides as compared to their temperate counterparts. **Chemosphere**, v. 220, p. 937–942, abr. 2019.

RODGHER, S. et al. Change in life cycle parameters and feeding rate of Ceriodaphnia silvestrii Daday (Crustacea, Cladocera) exposure to dietary copper. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 8, p. 826–833, 22 nov. 2008.

SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Review of Recent Ecotoxicological Studies on Cladocerans. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 41, n. 8, p. 1417–1430, 5 dez. 2006.

SEQUINATTO, L. et al. Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 768–772, 2013.

SILVA, E.; CEREJEIRA, M. J. Risk assessment of individual pesticides and their mixtures in surface waters. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 32–42, jul. 2012.

SOFYAN, A.; SHAW, J. R.; BIRGE, W. J. Metal trophic transfer from algae to cladocerans and the relative importance of dietary metal exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 1034, 2006.

STATSOFT. **Statistica** (data analysis software system)., 2014. Disponível em: <www.statsoft.com>. Acesso em: 16 abr. 2023

SUMON, K. A. et al. Environmental monitoring and risk assessment of organophosphate pesticides in aquatic ecosystems of north-west Bangladesh. **Chemosphere**, v. 206, p. 92–100, set. 2018.

TRIASSI, M. et al. 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,** v. 678, p. 741–754, ago. 2019.

VIEIRA, B. H. et al. Importance of different exposure routes on the toxicity of chromium to planktonic organisms. **Aquatic Ecology**, 24 ago. 2023.

WANG, Z.; YAN, C.; HYNE, R. V. Effects of dietary cadmium exposure on reproduction of saltwater cladoceran Moina monogolica Daday: Implications in water quality criteria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 365–372, 2 fev. 2010.

WILDING, J.; MALTBY, L. Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: implications for risk assessment**. Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 1795, 2006.

Apêndice A

Tabela 1. Valores da concentração efetiva CE50-48h (g L^{-1}) do Cloreto de Sódio e seus respectivos intervalos de confiança (IC) para 95% de confiabilidade.

Teste	CE50-48h	IC (95%)
1	2,01	1,78-2,25
2	1,82	1,70-1,93
3	1,65	1,54-1,75
4	1,43	1,25-1,60
5	1,39	1,20-1,58
6	1,45	1,37-1,54
7	1,48	1,28-1,68
8	1,95	1,46-2,43
9	1,31	1,17-1,44
10	1,35	1,07-1,62
11	1,45	1,31-1,59
12	1,55	1,34-1,76
13	1,37	1,20-1,54
14	1,42	1,31-1,53
15	1,21	0,96-1,46
16	1,43	1,30-157
17	1,48	1,36-1,61
18	1,47	1,23-1,71
19	1,44	1,33-1,56
20	1,45	1,23-1,66

Apêndice B

Tabela 2. Resultados e parâmetros de quantificação para Clorpirifós.

Parâmetro	Valor nominal (mg L^{-1})	Valor quantificado (mg L^{-1})	Limite de detecção (mg L^{-1})	Limite de quantificação (mg L^{-1})
Clorpirifós	1	1,445±0,186	0,004	0,015

Apêndice C

Tabela 3. Valores de X^2, graus de liberdade e p para cada *endpoint* analisado.

Endpoint	X^2	gl	p
Imobilidade	1,67	6	0,947
Crescimento	2,07	6	0,913
Reprodução	13,5	7	0,062
Concentração de Alga (Renovação 1)	6,00	6	0,423
Concentração de Alga (Renovação 2)	6,00	6	0,423
Concentração de Alga (Renovação 3)	6,00	6	0,423
Concentração de Alga (Renovação 4)	6,00	6	0,423