

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

LAÍS CONCEIÇÃO MENEZES DA SILVA

Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos da vinhaça e de agrotóxicos utilizados na  
produção da cana-de-açúcar sobre espécies aquáticas tropicais

São Carlos - SP

2022

LAÍS CONCEIÇÃO MENEZES DA SILVA

Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos da vinhaça e de agrotóxicos utilizados na produção da cana-de-açúcar sobre espécies aquáticas tropicais

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

Coorientador: Prof. Dr. Michiel Adriaan Daam

**VERSÃO CORRIGIDA**

São Carlos - SP

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

C586a Conceição Menezes da Silva, Lais  
Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos da vinhaça e de agrotóxicos utilizados na produção da cana-de-açúcar sobre espécies aquáticas tropicais  
Lais Conceição Menezes da Silva; orientador Evaldo Luiz Gaeta Espindola; coorientador Michiel Adriaan Daam. São Carlos, 2022.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2022.

1. Raphidocelis subcapitata. 2. Ceriodaphnia silvestrii. 3. Danio rerio. 4. Mesocosmos. 5. Herbicida. 6. Inseticida. 7. 2,4-D. 8. Fipronil. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **LAÍS CONCEIÇÃO MENEZES DA SILVA**.

Título da tese: "Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos da vinhaça e de agrotóxicos utilizados na produção da cana-de-açúcar sobre espécies aquáticas tropicais".

Data da defesa: 13/05/2022.

### Comissão Julgadora

### Resultado

Prof. Titular **Evaldo Luiz Gaeta Espindola** (Orientador)  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovada

Profa. Dra. **SuzeleiRodgher**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-São José dos Campos)

Aprovada

Dra. **Ana Letícia Madeira Sanches**

(Universidade do Estado de Santa Catarina/UDESC)

Aprovada

Profa. Dra. **Gisela de Aragão Umbuzeiro**

(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovada

Profa. Dra. **Aline Fernanda Campagna Fernandes**

(Universidade Federal Rural do Semi-Árido/UFERSA)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

*Ao meu mentor espiritual e a todos  
os anjos/amigos encarnados e  
desencarnados que me ajudaram  
nesse longo voo solo*

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro,

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental (EESC/USP),

Ao meu querido orientador Prof. Tit. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, por todo apoio, amizade, suporte profissional e psicológico,

Ao meu coorientador Prof. Dr. Michiel Adriaan Daam, pelo suporte em momentos difíceis do meu doutorado,

A minha amiga, colega de trabalho e supervisora Dra. Raquel Aparecida Moreira, por sua grande colaboração em todas as etapas do meu trabalho, pelas risadas e inspiração que me deu diariamente,

Aos membros do exame qualificação e da defesa de doutorado pelas contribuições,

Aos meus colegas de mesocosmos Marina Reghini, Thandy Junio, Danillo Athayde, Allan Ogura, Maria Paula Yoshii, Juliana Freitas, Laís Lopes e Laís Giroto, pois sem eles nada disso teria sido feito,

Ao técnico de laboratório Amandio de Menezes Nogueira, por toda colaboração nos experimentos de laboratório,

A Prof. Dra. Cassiana Montagner (UNICAMP) e sua orientanda Bianca Goulart, por todo suporte pessoal e profissional,

Ao Prof. Tit. Luiz Antonio Martinelli pela ótima liderança em nosso projeto temático e pelo suporte pessoal em minha fase final de doutoramento,

A Prof. Tit. Marisa Narciso Fernandes pelo uso das instalações do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC/UFSCAR) para as análises histopatológicas de *Danio rerio*,

As alunas Natália Viana e Natália Portruneli, do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (UFSCar), por toda colaboração nas análises histopatológicas,

Ao Prof. Dr. Hugo Sarmento e seus alunos pela colaboração e uso das instalações do Laboratório de Biodiversidade e Processos Microbianos (LBPM/UFSCar),

A todos os meus outros colegas de profissão e amigos que, de alguma forma, colaboraram para essa jornada ser cumprida com excelência. Muito obrigada!

*“Cada dia que passa demandamos mais insumos de um planeta com recursos finitos. Poluímos o ar, contaminamos a água, o solo e matamos outros seres vivos. – Quem vai proteger o planeta de nós? perguntou o ambientalista. E foi assim que a história começou...”*

Laís C. M. Silva (2022)

## RESUMO

SILVA, L. C. M. **Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos da vinhaça e de agrotóxicos utilizados na produção da cana-de-açúcar sobre espécies aquáticas tropicais.** 2022. 175 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Com o aumento crescente da demanda energética e o incentivo da utilização dos biocombustíveis, espera-se que a produção da cana-de-açúcar no Brasil cresça ainda mais nos próximos anos. No entanto, apesar das monoculturas contribuírem com a economia do país, diversos problemas ambientais estão relacionados com esta prática agrícola. No caso da produção da cana-de-açúcar, a geração de resíduos (como a vinhaça) e o elevado uso de agrotóxicos, os quais contribuem para contaminação dos diferentes compartimentos ambientais, incluindo os ecossistemas aquáticos, por meio de processos de deriva de pulverização, lixiviação, escoamento e percolação. A partir deste cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição da vinhaça e de agrotóxicos amplamente utilizados na produção de cana-de-açúcar, sobre espécies aquáticas tropicais. Para isso, foram avaliados os efeitos ecotoxicológicos da vinhaça e dos agrotóxicos DMA<sup>®</sup> 806 BR (herbicida) e Regent<sup>®</sup> 800 WG (inseticida), isolados e em mistura, por meio de testes laboratoriais e modelos ecossistêmicos (mesocosmos), mensurando efeitos reprodutivos, comportamentais, morfológicos, fisiológicos e letais em três níveis da cadeia trófica aquática. Para tal, foram utilizadas as espécimes-teste *Raphidocelis subcapitata* (produtor primário), *Ceriodaphnia silvestrii* (consumidor primário) e *Danio rerio* (consumidor secundário). Os resultados obtidos mostraram que a vinhaça e o inseticida fipronil foram tóxicos para o cladóceros e o peixe, eliminando ambas as espécies em doses que estão na faixa das concentrações reportadas no ambiente (48h-CE<sub>50</sub> 3,9 µg/L e 96h-CL<sub>50</sub> 172 µg/L, respectivamente), causando também efeitos subletais, como reprodução e alimentação. Para alga, somente na exposição laboratorial a vinhaça (1,3 % (V/V)) causou efeito inibitório significativo. O herbicida 2,4-D causou efeitos letais em altas doses para *D. rerio* nos experimentos laboratoriais (> 440 mg/L) e alguns efeitos significativos na alimentação, comportamento e morfologia de brânquias tanto nas doses utilizadas em laboratório quanto em mesocosmos (≤ 447 µg/L). No caso das misturas, para *R. subcapitata*, a mistura dos agrotóxicos não provocou diferenças no crescimento algal quando comparada aos agrotóxicos isolados, no entanto, a adição da vinhaça teve alto efeito inibitório em laboratório, efeito que não foi significativo com as amostras dos mesocosmos. A vinhaça também potencializou os efeitos da mistura para *C. silvestrii*, enquanto as misturas binárias apresentaram efeito antagônico em baixas doses. E para *D. rerio* as misturas binárias foram



mais tóxicas que os agrotóxicos isolados, e a adição da vinhaça provocou 100 % de mortalidade na espécie. Em conclusão, em um cenário atual de expansão agrícola e afrouxamento de políticas ambientais, a biodiversidade e equilíbrio dos ecossistemas aquáticos tropicais estão em risco. As principais consequências e grande parte da literatura atual sobre as substâncias avaliadas são discutidas neste estudo.

**Palavras-chave:** *Raphidocelis subcapitata*. *Ceriodaphnia silvestrii*. *Danio rerio*. Mesocosmos. Herbicida. Inseticida. 2,4-D. Fipronil.

## ABSTRACT

SILVA, L. C. M. **Evaluation of the ecotoxicological effects of vinasse and pesticides used in sugarcane production on tropical aquatic species.** 2022. 175 p. Thesis (Doctorate degree) – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2022.

With the increasing demand for energy and the incentive to use biofuels, it is expected that the production of sugarcane in Brazil will grow even more in the coming years. Despite that monoculture contribute to the country's economy, several environmental problems are related to this agricultural practice. In the case of sugarcane production, the generation of waste (such as vinasse) and the high use of pesticides, which contribute to the contamination of different environmental compartments, including aquatic ecosystems, through spray drift, leaching, runoff and percolation processes, may be highlighted. From this scenario, the objective of this study was to evaluate the effects of the addition of vinasse and pesticides widely used in sugarcane production, on the tropical aquatic species. For this, the ecotoxicological effects of vinasse and the pesticides DMA<sup>®</sup> 806 BR (herbicide) and Regent<sup>®</sup> 800 WG (insecticide), isolated and in mixture, were evaluated through laboratory tests and model ecosystems (mesocosms), evaluating reproductive, behavioral, morphological, physiological and lethal effects at three trophic levels of the aquatic food chain. For this, the species *Raphidocelis subcapitata* (primary producer), *Ceriodaphnia silvestrii* (primary consumer) and *Danio rerio* (secondary consumer) were used. The results obtained showed that vinasse and the insecticide fipronil were toxic to the cladoceran and fish, extinguishing both species at doses that are in the range of concentrations reported in the environment (48h-EC<sub>50</sub> 3,9 µg/L e 96h-LC<sub>50</sub> 172 µg/L, respectively) also causing sublethal effects such as reproduction and feeding. For algae, only in the laboratory exposure vinasse (1.3% (V/V)) caused a significant inhibitory effect. The herbicide 2,4-D caused lethal effects at high doses for *D. rerio* in laboratory experiments (> 440 mg/L) and some significant effects on feeding, behavior and gill morphology both at doses used in laboratory and in mesocosms (≤ 447 µg/L). In the case of mixtures, for *R. subcapitata*, the mixture of pesticides did not cause differences in algal growth when compared to isolated pesticides, however, the addition of vinasse had a high inhibitory effect in the laboratory, an effect that was not significant with the mesocosm samples. Vinasse also potentiated the effects of the mixture for *C. silvestrii*, while the binary mixtures showed an antagonistic effect at low doses. And for *D. rerio* the binary mixtures were more toxic than the isolated pesticides, and the addition of vinasse caused 100% mortality in the species. In conclusion, in a current scenario of agricultural expansion and relaxation of environmental policies, the biodiversity and balance

of tropical aquatic ecosystems are at risk. The main consequences and much of the current literature on the substances evaluated are discussed in this study.

**Keywords:** *Raphidocelis subcapitata*. *Ceriodaphnia silvestrii*. *Danio rerio*. Mesocosms. Herbicide. Insecticide. 2,4-D. Fipronil.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Produção de cana-de-açúcar no Brasil (1900-2020).....	3
<b>Figura 2.</b> Vias de degradação do herbicida 2,4-D .....	8
<b>Figura 3.</b> Vias de degradação do inseticida fipronil .....	9
<b>Figura 4.</b> Área de estudo em modelos ecossistêmicos .....	22
<b>Figura 5.</b> Contaminação dos mesocosmos utilizados no estudo. ( <b>A:</b> inserção dos agrotóxicos em M e <b>B:</b> inserção da vinhaça em V). As setas mostram os controles vedados no momento da contaminação. ....	23
<b>Figura 6.</b> Fluxograma das etapas experimentais realizadas.....	23
<b>Figura 7.</b> Células da alga verde cosmopolita <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....	31
<b>Figura 8.</b> Testes laboratoriais com o herbicida DMA <sup>®</sup> 806 BR com <i>R. subcapitata</i> ( <b>A:</b> densidade celular e <b>B:</b> taxa média de crescimento específico). Asteriscos (*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ ). ....	36
<b>Figura 9.</b> Testes laboratoriais com o inseticida Regent <sup>®</sup> 800 WG com <i>R. subcapitata</i> ( <b>A:</b> densidade celular e <b>B:</b> taxa média de crescimento específico). Asteriscos (*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ ). ....	37
<b>Figura 10.</b> Médias do crescimento de <i>R. subcapitata</i> expostas as concentrações do experimento em mesocosmos para os tratamentos C, D, F, M, V e MV em meio oligo. Asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas com o controle ( $p < 0,05$ ). ....	41
<b>Figura 11.</b> Média do tamanho celular ( <b>A</b> ), complexidade celular ( <b>B</b> ) e Clorofila <i>a</i> ( <b>C</b> ) de <i>R. subcapitata</i> expostas as concentrações do experimento em mesocosmos para os tratamentos C, D, F, M, V e MV em meio oligo. Asteriscos (*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ ). ....	43
<b>Figura 12.</b> Espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas por <i>R. subcapitata</i> expostas aos tratamentos por 96 horas.....	44
<b>Figura 13.</b> Médias do crescimento de <i>R. subcapitata</i> exposta as amostras coletadas dos tratamentos C, D, F, M, V e MV em mesocosmos. As letras “CL” indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle do laboratório (CL) e a letra “C” diferenças com o controle (C) dos mesocosmos ( $p < 0,05$ ). ....	45
<b>Figura 14.</b> Média do tamanho celular ( <b>A</b> ), complexidade celular ( <b>B</b> ) e Clorofila <i>a</i> ( <b>C</b> ) de <i>R. subcapitata</i> exposta as amostras coletadas dos tratamentos C, D, F, M, V e MV em mesocosmos. As letras “CL” indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle do laboratório (CL) e a letra “C” diferenças com o controle dos mesocosmos ( $p < 0,05$ ). ....	47
<b>Figura 15.</b> Espécie de cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	57
<b>Figura 16.</b> Armadilhas inseridas nos mesocosmos para os testes de toxicidade aguda com <i>C. silvestrii</i> .....	61
<b>Figura 17.</b> Experimento de taxa de alimentação de <i>C. silvestrii</i> em câmara giratória .....	62
<b>Figura 18.</b> Curva da porcentagem de sobrevivência de <i>C. silvestrii</i> em função das concentrações testadas. ( <b>A</b> ) DMA <sup>®</sup> 806 BR (i.a. 2,4-D) ( <b>B</b> ) Regent <sup>®</sup> 800 WG (i.a. fipronil) e ( <b>C</b> ) Vinhaça. Os pontos destacados fora da curva apontam os valores de CE <sub>10</sub> , 20 e 50.....	67
<b>Figura 19.</b> Isoblograma dos efeitos da mistura de agrotóxicos na imobilidade de <i>C. silvestrii</i> . ( <b>A</b> ) dependente do nível de dose (DL) do modelo de adição de concentração (CA) e ( <b>B</b> ) dependente do nível de dose (DL) do modelo de ação independente (IA).....	68

<b>Figura 20.</b> Porcentagem de sobrevivência de <i>C. silvestrii</i> no teste agudo de misturas ternárias. As letras em cima da barra dos tratamentos representam a diferença significativa do tratamento com relação ao tratamento isolado do controle (C), Regent® (F) e Vinhaça (V).....	70
<b>Figura 21.</b> Gráfico comparativo de sobrevivência de <i>C. silvestrii</i> nos testes de toxicidade de misturas ternárias e binárias. Os asteriscos (*) representam diferença significativa entre elas. ....	70
<b>Figura 22.</b> Fêmeas no final do teste crônico. (A) Fêmea do controle após a terceira ninhada. (B) Fêmea com ovos inviáveis (que não se desenvolveram) por exposição ao herbicida DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D). ....	74
<b>Figura 23.</b> Dados de reprodução, primeira ninhada e taxa intrínseca de aumento populacional (número médio ± desvio padrão) de <i>C. silvestrii</i> após exposição isolada de 8 dias a diferentes concentrações dos agrotóxicos DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D), Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e à vinhaça da cana-de-açúcar. O asterisco indica o valor significativamente diferente do controle ( $p \leq 0,05$ ). ....	77
<b>Figura 24.</b> Isoblograma dos efeitos da mistura de agrotóxicos na reprodução de <i>C. silvestrii</i> . (A) antagonismo do modelo de adição de concentração (CA) e (B) antagonismo do modelo de ação independente (IA).....	79
<b>Figura 25.</b> Média de neonatas por fêmea de <i>C. silvestrii</i> durante teste crônico de misturas ternárias. As letras em cima da barra dos tratamentos representam a diferença significativa do tratamento com relação ao tratamento isolado do controle (C), Regent® (F), DMA® (D) e Vinhaça (V).....	81
<b>Figura 26.</b> Taxa de sobrevivência de <i>C. silvestrii</i> nos testes de toxicidade aguda em mesocosmos ao longo do tempo.....	83
<b>Figura 27.</b> Taxa de sobrevivência de <i>C. silvestrii</i> em laboratório com amostras dos mesocosmos a partir de 14 dias após a contaminação. As letras em cima da barra de cada tratamento representam a diferença estatística significativa dele em relação aos outros tratamentos, sendo: C (controle), D (DMA®), F (Regent®), M (Mistura), V (Vinhaça) e MV (Mistura com vinhaça).....	86
<b>Figura 28.</b> Média de produção de neonatas por tratamentos após 21 dias da contaminação. As letras em cima das barras representam os tratamentos que eles são diferentes estatisticamente, sendo: Controle (C), DMA® (D), Regent® (F), Mistura (M) e Vinhaça (V).....	87
<b>Figura 29.</b> Comparação das médias da produção de neonatas por fêmea de <i>C. silvestrii</i> nos testes crônicos com amostras dos mesocosmos. Os códigos do gráfico em cima de cada barra representam de qual amostragem cada uma é diferente estatisticamente, sendo: Controle (C), DMA® (D), Regent® (F), Mistura (M) e Vinhaça (V).....	89
<b>Figura 30.</b> Média em dias da primeira reprodução das fêmeas ao longo da amostragem. O asterisco (*) indica quando o tratamento foi diferente da média padrão estabelecida em laboratório para a espécie (4 dias). As letras na legenda representam os tratamentos Controle (C), DMA® (D), Regent® (F), Mistura (M) e Vinhaça (V). ....	90
<b>Figura 31.</b> Média dos valores da taxa intrínseca de aumento populacional ( $r$ ) para cada tratamento ao longo das amostragens. O asterisco (*) indica quando o tratamento foi diferente dos valores obtidos para o controle de laboratório (ASTM). As letras na legenda representam os tratamentos Controle (C), DMA® (D), Regent® (F), Mistura (M) e Vinhaça (V). ....	91

<b>Figura 32.</b> Fêmeas sobreviventes exposta anteriormente a concentração de 90 mg/L de 2,4-D ao final do teste pós-exposição (réplica 1,2,3,4,7 e 9) .....	99
<b>Figura 33.</b> Fêmeas sobreviventes exposta anteriormente a concentração de 110 mg/L de 2,4-D ao final do teste pós-exposição (réplica 5, 7 e 9) .....	99
<b>Figura 34.</b> Peixe tropical <i>Danio rerio</i> .....	117
<b>Figura 35.</b> Experimento de mistura de agrotóxicos com <i>D. rerio</i> .....	120
<b>Figura 36.</b> Câmara-teste de <i>D. rerio</i> inserida em mesocosmos .....	121
<b>Figura 37.</b> <i>D. rerio</i> submetido aos testes de pós-exposição (A) comportamento natatório e (B) alimentação com <i>C. silvestrii</i> .....	122
<b>Figura 38.</b> <i>D. rerio</i> com curvamento da coluna vertebral pós-exposição ao inseticida fipronil .....	125
<b>Figura 39.</b> Relação entre peixes normais e debilitados na exposição à mistura de agrotóxicos .....	125
<b>Figura 40.</b> Sobrevivência média (%) de <i>D. rerio</i> exposto em mesocosmos (T1, T3 e T4) e a água dos mesocosmos em laboratório (T5). O asterisco (*) indica tratamento diferente do controle. ....	132
<b>Figura 41.</b> Comparação dos parâmetros físicos e químicos dos tratamentos C, V e MV. O eixo secundário (lado direito) é a escala dos níveis de oxigênio dissolvido (OD) e o eixo primário (lado esquerdo dos demais parâmetros).....	134
<b>Figura 42.</b> Comportamento natatório de <i>D. rerio</i> pós-exposição aos tratamentos em mesocosmos. As letras representam os tratamentos controle (C), DMA <sup>®</sup> (D), Regent <sup>®</sup> (F) e Mistura (M) nos tempos T1 (contaminação), T3 (após 7 dias) e T4 (após 14 dias). Os asteriscos (*) representam diferenças estatísticas com o controle ( $p < 0,05$ ) .....	135
<b>Figura 43.</b> Teste de alimentação pós-exposição em mesocosmos com <i>D. rerio</i> .....	138
<b>Figura 44.</b> Teste de alimentação pós-exposição em laboratório com <i>D. rerio</i> . Asteriscos (*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ ).....	138
<b>Figura 45.</b> Média $\pm$ DP de índice de alteração histopatológica (IAH) para brânquias de <i>D. rerio</i> expostos aos tratamentos C (controle), D (DMA <sup>®</sup> ) e F (Regent <sup>®</sup> ) no dia da contaminação dos mesocosmos. Asteriscos (*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ ).....	141
<b>Figura 46.</b> Média de índice de alteração histopatológica (IAH) para brânquias de <i>D. rerio</i> expostos em laboratório a água dos tratamentos dos mesocosmos C (controle), D (DMA <sup>®</sup> ) e F (Regent <sup>®</sup> ) e M (DMA <sup>®</sup> + Regent <sup>®</sup> ) de 21 dias após a contaminação. Asteriscos (*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ ).....	142
<b>Figura 47.</b> Filamentos branquiais e lamelas de <i>D. rerio</i> expostos aos tratamentos C, D, F e M. (A) Seta preta indica fusão parcial lamelar. Seta branca indica hipertrofia das células lamelares. Asterisco branco indica fusão total das lamelas (em F). (B) Fusão total das lamelas e hiperplasia (em D). (C) Setas brancas contínuas indicam hiperplasia das células cloreto. Seta branca pontilhada indica hipertrofia da célula cloreto (em M). (D) Congestão lamelar (em C). (E) <i>Lifting</i> de epitélio lamelar (em D). (F) Aneurisma apical (em C).....	144

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação de ingredientes ativos de agrotóxicos *.....	4
<b>Tabela 2.</b> Relação de estudos de toxicidade requeridos para agrotóxicos* .....	12
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros físicos e químicos das amostragens dos mesocosmos e dados climatológicos do volume de chuva .....	25
<b>Tabela 4.</b> Média da concentração $\pm$ desvio padrão (DP) dos agrotóxicos ao longo do tempo ( $\mu\text{g/L}$ ) para C (controle), D (2,4-D), F (fipronil), M (mistura dos agrotóxicos), V (vinhaça) e MV (mistura dos agrotóxicos e vinhaça).....	27
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros físicos e químicos da vinhaça bruta .....	28
<b>Tabela 6.</b> Valores de $\text{CE}_{50}/\text{CI}_{50}$ de 2,4-D disponíveis na literatura para espécies de algas .....	38
<b>Tabela 7.</b> Valores de toxicidade aguda da vinhaça para cladóceros.....	67
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros e ajustes dos modelos de referência CA e IA aplicados ao teste agudo de <i>C. silvestrii</i> exposta por 48 horas a mistura de DMA <sup>®</sup> 806 BR (i.a. 2,4-D) e Regent <sup>®</sup> 800 WG (i.a. fipronil).....	68
<b>Tabela 9.</b> Valores de CE para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> em testes agudos e crônicos da Vinhaça e dos agrotóxicos DMA <sup>®</sup> 806 BR (i.a. 2,4-D) e Regent <sup>®</sup> 800 WG (i.a. fipronil) .....	74
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros e ajustes dos modelos de referência de CA e IA aplicados ao teste crônico de <i>C. silvestrii</i> exposta por 8 dias a mistura de DMA <sup>®</sup> 806 BR (i.a. 2,4-D) e Regent <sup>®</sup> 800 WG (i.a. fipronil).....	80
<b>Tabela 11.</b> Média dos parâmetros das amostras coletadas em mesocosmos. As letras representam os tratamentos do Controle (C), DMA <sup>®</sup> (D), Regent <sup>®</sup> (F), Mistura (M), Vinhaça (V) e Mistura com vinhaça (MV). .....	93
<b>Tabela 12.</b> Média da taxa de alimentação de <i>C. silvestrii</i> após exposição em mesocosmos e laboratório aos tratamentos avaliados no experimento. O asterisco representa a diferença estatística com o controle .....	95
<b>Tabela 13.</b> Produção de neonatas de cada fêmea durante o experimento de reprodução pós-exposição. Os números em vermelho significam a morte da adulta. ....	98
<b>Tabela 14.</b> Concentrações utilizadas no teste de mistura com <i>D. rerio</i> . F (fipronil), D (2,4-D) e M (mistura).....	120
<b>Tabela 15.</b> Frequência de danos histológicos nas brânquias de <i>D. rerio</i> .....	143

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
2.1. Agricultura e a produção sucroalcooleira no Brasil.....	2
2.2. Agrotóxicos: função, classificação, mercado e o uso no cultivo de cana-de-açúcar ...	4
2.3. 2,4-D e fipronil: características e mecanismo de ação.....	6
2.4. O uso da vinhaça da cana-de-açúcar como fertilizante: vantagens e desvantagens ..	10
2.5. A ecotoxicologia como instrumento na avaliação de impactos ambientais.....	11
<b>3. OBJETIVOS E HIPÓTESES.....</b>	<b>20</b>
3.1. Objetivo geral .....	20
3.2. Objetivos específicos .....	20
3.3. Hipóteses.....	20
<b>4. DESIGN EXPERIMENTAL.....</b>	<b>21</b>
4.1. Descrição da instalação e procedimentos .....	21
4.2. Análises químicas.....	23
4.2.1. Parâmetros físicos e químicos .....	24
4.2.2. Quantificação dos agrotóxicos.....	27
4.2.3. Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar .....	27
Referências .....	29
<b>5. CAPÍTULO I – Ensaio de toxicidade com <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....</b>	<b>30</b>
5.1. Introdução .....	30
5.2. Material e Métodos .....	32
5.2.1. Cultivo e teste de sensibilidade .....	32
5.2.2. Testes em laboratório.....	33
5.2.3. Testes com amostras dos mesocosmos.....	34
5.2.4. Análise estatística .....	34
5.3. Resultados e Discussão .....	35
5.3.1. Teste de Sensibilidade .....	35
5.3.2. Testes de toxicidade em laboratório .....	35
5.3.3. Testes de toxicidade com amostras dos mesocosmos .....	45
5.4. Conclusão.....	49
Referências .....	51



<b>6. CAPÍTULO II – Ensaio de toxicidade com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i></b> .....	<b>56</b>
6.1. Introdução .....	56
6.2. Material e Métodos .....	58
6.2.1. Organismo-teste e condições da cultura .....	58
6.2.2. Testes de toxicidade aguda em laboratório: agrotóxicos e vinhaça, isolados e em mistura .....	58
6.2.3. Testes crônicos em laboratório: produtos isolados e em mistura .....	59
6.2.4. Testes de toxicidade aguda em mesocosmos.....	60
6.2.5. Testes de toxicidade aguda e crônica com amostras de água dos mesocosmos .	61
6.2.6. Testes pós-exposição: alimentação com <i>R. subcapitata</i> e reprodução.....	61
6.2.7. Análise estatística .....	62
6.3. Resultados e Discussão .....	63
6.3.1. Testes agudos em laboratório: produtos isolados e em mistura .....	63
6.3.2. Testes crônicos em laboratório: produtos isolados e em mistura .....	73
6.3.3. Testes agudos em mesocosmos .....	83
6.3.4. Testes agudos, crônicos e populacionais com amostras do mesocosmos .....	84
6.3.5. Testes pós-exposição: alimentação com <i>R. subcapitata</i> e reprodução.....	94
6.3.5.1. Alimentação .....	94
6.3.5.2. Reprodução .....	97
6.4. Conclusão.....	101
Referências .....	103
<b>7. CAPÍTULO III – Ensaio de toxicidade com <i>Danio rerio</i></b> .....	<b>116</b>
7.1. Introdução .....	116
7.2. Material e Métodos .....	118
7.2.1. Organismo-teste e condições da aclimação .....	118
7.3. Resultados e discussão.....	124
7.3.3. Testes de toxicidade em mesocosmos .....	130
7.4. Conclusão.....	147
Referências .....	149
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>157</b>
Referências .....	161

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura foi uma das primeiras atividades economicamente importantes para o Brasil após a colonização dos portugueses em 1500, e mesmo depois de 522 anos de história, a monocultura de exportação continua sendo uma das atribuições principais desta atividade (MIRANDA, 2020; GRANDIS; PALACIOS; BUCKERIDGE, 2022). E a cada ano, o investimento em grandes cultivos como a soja, milho e cana-de-açúcar crescem, atrelado a necessidade de atender a demanda por estes recursos e explorar uma das principais vantagens que o Brasil possui: área territorial, água e ótimo clima. No entanto, apesar das inúmeras vantagens que a agricultura pode trazer para a economia do país, e que claramente não podem ser ignoradas, existem também desvantagens e, dentre elas, está a contaminação dos ecossistemas naturais com consequente perda da biodiversidade (BALLESTER et al., 1999; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2005).

No cenário atual, existem grandes investimentos na agricultura e seus recursos. Desde 2017, a liberação de uso e registro de novas formulações e ingredientes ativos de agrotóxicos cresce exponencialmente (AGROFIT, 2020), e é evidente que a preocupação com a avaliação da ecotoxicidade destes produtos não segue o mesmo ritmo. Por isso, é tão crucial analisar e quantificar estes efeitos e suas possíveis consequências para o meio ambiente. E notoriamente, quanto mais próximos da realidade em campo, mais preocupantes são os resultados obtidos (VAN DEN BRINK et al., 2005). Neste sentido, os estudos em modelos ecossistêmicos combinados com estudos em laboratório são uma ferramenta importante para o panorama mundial da alta produção de alimentos e insumos para a indústria, para uma coexistência equilibrada entre a economia e a preservação da biodiversidade.

Fundamentado nas informações obtidas sobre a produção de cana-de-açúcar, o elevado uso de agrotóxicos utilizados para este fim e as informações disponíveis sobre possíveis efeitos para os ecossistemas naturais, esta tese de doutorado foi elaborada a partir da avaliação dos compostos-teste (DMA<sup>®</sup> 806 BR, Regent<sup>®</sup> 800 WG e vinhaça) isolados e em mistura em testes laboratoriais letais e subletais e em modelos ecossistêmicos, utilizando três espécies de diferentes níveis tróficos: a alga cosmopolita *Raphidocelis subcapitata*, o cladóceros nativo *Ceriodaphnia silvestrii* e o peixe tropical *Danio rerio*. Através dos resultados obtidos e da discussão realizada, este trabalho espera ampliar o conhecimento sobre as consequências ambientais da utilização dessas substâncias na agricultura intensiva, com o intuito de proteger as comunidades aquáticas de ambientes tropicais.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

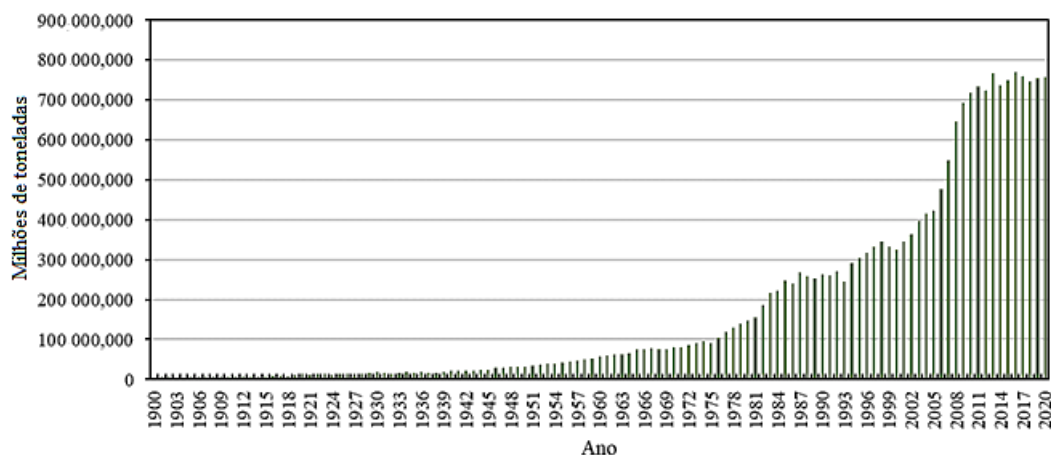
### **2.1. Agricultura e a produção sucroalcooleira no Brasil**

O desenvolvimento da agricultura no Brasil está atrelado com a formação econômica do país. Com o início da colonização europeia pelos portugueses, a agricultura de autoconsumo realizada pelos nativos locais foi substituída pela extração de pau-brasil e a agricultura de larga escala (MIRANDA, 2020; GRANDIS; PALACIOS; BUCKERIDGE, 2022). A primeira monocultura estabelecida no país foi a cana-de-açúcar, sendo ela o principal pilar da economia brasileira entre os séculos XVI e XVIII, tornando o Brasil um dos destaques na produção mundial de açúcar. A região nordeste foi o lugar destinado para as grandes plantações de cana-de-açúcar da época, que eram realizadas em grandes propriedades com uso de trabalho escravo (MIRANDA, 2020; GRANDIS; PALACIOS; BUCKERIDGE, 2022).

Concomitante com o crescimento do mercado de cana-de-açúcar em outros países e a necessidade de alimento para garantir a subsistência da população, outras atividades, por exemplo a pecuária, e outras culturas, como a mandioca e o milho, cresceram para atender a demanda (PRADO JÚNIOR, 1990).

Após um período de declínio na produção por causa da exploração da mineração com o ciclo do ouro (início ao final do século XVIII), a agricultura voltou a ser destaque da economia e a cana-de-açúcar expandiu suas fronteiras, iniciando a produção na região Sudeste nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (PRADO JÚNIOR, 1990). No entanto, algumas décadas depois a cana-de-açúcar deixou de ser o grande destaque da produção agrícola do Brasil, sendo este lugar ocupado pelo café até o final da terceira década do século XX (GRANDIS; PALACIOS; BUCKERIDGE, 2022).

Após 1950, com a modernização agrícola no Brasil sendo estimulada, a cana-de-açúcar, entra em um novo ciclo de produção com a objetivo de não só produzir para atender as demandas de consumo de açúcar, mas também para a produção de combustível. Na década de 1970, com a crise internacional de petróleo, foi criado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) pelo decreto nº 76.593/1975 com o intuito de garantir o abastecimento de combustível para o país e substituir a gasolina desenvolvendo a indústria da cana-de-açúcar e do álcool (MIRANDA, 2020). Nos anos subsequentes, a produção aumentou exponencialmente e segue estável atualmente (Figura 1).

**Figura 1.** Produção de cana-de-açúcar no Brasil (1900-2020)

**Fonte:** IPEA data – <http://www.ipeadata.gov.br> (2022)

Atualmente, a cana-de-açúcar tem a terceira maior área agrícola do país (9.927.937 ha), ficando atrás somente da soja (38.974.763 ha) e do milho (19.294.104 ha) (IBGE, 2022). As duas regiões com maior área destinada à esta cultura é a região Sudeste (5.155,70 ha) e a região Centro-Oeste (1.808,40 ha). O estado com maior produção é o estado de São Paulo, com uma área plantada de 4,4 mil hectares e uma produtividade de 354 mil toneladas na safra de 2020/2021, cerca de 50 % da produção brasileira que na mesma safra foi de cerca de 654 mil toneladas em 8,6 mil hectares (CONAB, 2021). Estes valores fazem do Brasil o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e etanol (OCDE/FAO, 2019), e a produção tem um mercado que tende a aumentar consideravelmente devido ao incentivo à substituição dos combustíveis fósseis pelo etanol. Neste cenário, é esperado para a próxima safra da cana-de-açúcar uma produção de 33,9 milhões de toneladas de açúcar e 24 bilhões de litros de etanol. Dentre eles, 20 milhões de toneladas de açúcar e 11 bilhões de litros de etanol, somente no estado de São Paulo (CONAB, 2021). Estes números agregam muito à economia do país. Por exemplo, entre 2012 e 2018, o setor sucroenergético do país gerou 70 bilhões de dólares com a exportação de açúcar e 8 bilhões de dólares com a exportação de etanol.

Em contrapartida, apesar de monoculturas como a cana-de-açúcar contribuírem com a economia, diversos problemas ambientais estão relacionados com as atividades agrícolas, entre elas, no caso da cana-de-açúcar, pode-se citar a geração de resíduos (como a vinhaça) e a aplicação intensiva de agrotóxicos.

## 2.2. Agrotóxicos: função, classificação, mercado e o uso no cultivo de cana-de-açúcar

Agrotóxicos são substâncias químicas que são utilizadas principalmente na agricultura e silvicultura para a proteção contra insetos, ervas daninhas e outros seres vivos que podem prejudicar o rendimento e a eficiência do cultivo (RANI et al., 2021). Os ingredientes ativos de muitos destes produtos também podem ser usados na jardinagem doméstica, veterinária, agropecuária e medicina para controlar, por exemplo, o crescimento de plantas, controle de pulgas e carrapatos e medicamentos para o controle de vetores de doenças (FIOCRUZ, 2018). As classes de agrotóxicos mais conhecidos são os inseticidas, herbicidas, fungicidas e rodenticidas. A classificação completa dos ingredientes destes produtos é disponibilizada pela US EPA (2021) e é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação de ingredientes ativos de agrotóxicos \*

<b>Ingrediente ativo</b>	<b>Função</b>
Acaricidas	matam os ácaros que se alimentam de plantas e animais
<b>Algicidas</b>	<b>matam algas em lagos, canais, piscinas, tanques de água e outros locais</b>
Anti- incrustantes	matam ou repelem organismos que se prendem a superfícies subaquáticas, como cracas que se agarram ao fundo do barco
<b>Antimicrobianos ou biocidas</b>	<b>matam microrganismos, como bactérias e vírus</b>
Atrativos	atraem pragas para uma armadilha ou isca, por exemplo, atraem um inseto ou roedor para uma armadilha
<b>Biopesticidas</b>	<b>derivados de materiais naturais, como animais, plantas, bactérias e certos minerais</b>
Desfolhantes	fazem com que as folhas ou folhagem caiam de uma planta, geralmente para facilitar a colheita
<b>Dessecantes</b>	<b>promovem a secagem de tecidos vivos, como copas de plantas indesejadas</b>
Desinfetantes e sanitizantes	matam ou inativam microrganismos produtores de doenças em objetos inanimados
<b>Fungicidas</b>	<b>matam fungos (incluindo ferrugem, bolor, bolor e ferrugem)</b>
Fumigantes	produzem gás ou vapor destinados a destruir pragas, por exemplo, em edifícios ou solo

<b>Feromônios</b>	<b>interrompem o comportamento de acasalamento dos insetos</b>
Herbicidas	matam ervas daninhas e outras plantas que crescem onde não são desejadas
<b>Inseticidas</b>	<b>matam insetos e outros artrópodes</b>
Moluscicidas	matam caracóis e lesmas
<b>Nematicidas</b>	<b>matam nematoides</b>
Ovicidas	matam os ovos de insetos e ácaros
<b>Protetores incorporados às plantas</b>	<b>são substâncias que as plantas produzem a partir de material genético que foi adicionado à planta</b>
Reguladores de crescimento de insetos	interrompem a muda, amadurecendo do estágio de pupa até o adulto, ou outros processos de vida dos insetos
<b>Reguladores de crescimento de plantas</b>	<b>alteram a taxa esperada de crescimento, floração ou reprodução das plantas (não inclui fertilizantes)</b>
Repelentes	repelem pragas, incluindo insetos (como mosquitos) e pássaros
<b>Rodenticidas</b>	<b>controlam camundongos e outros roedores</b>

---

\*Adaptado de US EPA (2021)

Segundo dados de 2019 da FAO (2021), o mercado global de agrotóxicos aumentou em 36 % entre 2000 e 2019, chegando a um consumo de 4,2 milhões de toneladas em 2019. O valor agregado da agricultura, silvicultura e pesca no mundo foi de 3,5 trilhões de dólares no mesmo ano. Entre os continentes, os maiores contribuintes desse valor e do consumo de agrotóxicos em ordem decrescente são a Ásia, Américas (incluindo Brasil), Europa, África e Oceania. No entanto, na taxa de aplicação por hectare, as Américas tomam a frente da Ásia, com uma média de 3,7 kg/ha, sendo maior que a média mundial de 2,7 kg/ha. A China foi o país que mais utilizou agrotóxicos, com o consumo de 1,8 milhões de toneladas, o que equivale a 42 % do consumo mundial, em segundo e terceiro lugar ficam os Estados Unidos (0,407 milhões) e o Brasil (0,377 milhões).

Com relação ao Brasil, o valor agregado da agricultura, silvicultura e pesca foi de 86,4 milhões de dólares, o que corresponde a 4,8 % do PIB nacional. Isso corresponde a 63 milhões de hectares utilizados para a agricultura, com um consumo de 58,1 % de toda água utilizada no país e o uso de 377 mil toneladas de agrotóxicos, com uma taxa de 5,94 kg/ha (FAO, 2021). Para os próximos anos espera-se que este consumo aumente cada vez mais, devido à crescente liberação de novas formulações desde 2016 (SALATI, 2021). A partir de 2016, um total de

2600 novos registros de agrotóxicos foram realizados no país, com o recorde anual e de toda a série histórica no ano passado de 500 novos registros (SALATI, 2021), sendo que muitos destes novos registros contém ingredientes ativos proibidos em outros países devido o potencial tóxico para o meio ambiente e a saúde humana (CARNEIRO, 2015).

As regiões do país que se destacam no consumo destes produtos são Sul, Centro-Oeste e Sudeste (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Dentro das regiões, os estados que mais compraram agrotóxicos entre 2015-2017 foram Mato Grosso, São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, correspondendo a 58 % das compras totais do país, sendo que São Paulo foi o estado com maior taxa de aplicação por hectare (9,3 kg/ha), 72 % maior que a média aplicada no Brasil (MORAES, 2019). E este alto consumo de agrotóxicos está conectado com a alta produção de cana-de-açúcar no estado. Para este cultivo, existem disponíveis atualmente 333 ingredientes ativos e 2316 produtos formulados para uso no Brasil (AGROFIT, 2020). Entre os mais utilizados no estado de São Paulo estão 2,4-D, ametrina, clomazona, fipronil, hexazinona+diurom, imidacloprido e metano arseniato ácido monossódico (MSMA) (IEA, 2016), com o herbicida 2,4-D ocupando o lugar de segundo ingrediente ativo mais utilizado no país (MORAES, 2019). Neste contexto, o presente trabalho selecionou para a avaliação ecotoxicológica dois ingredientes ativos com funções diferentes a partir de informações de venda/consumo: o herbicida 2,4-D e o inseticida fipronil em suas formas comerciais DMA<sup>®</sup> 806 BR e Regent<sup>®</sup> 800 WG, respectivamente.

### **2.3. 2,4-D e fipronil: características e mecanismo de ação**

O herbicida 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) é um dos ingredientes ativos mais antigos utilizados (síntese na década de 40) e que continua sendo um dos mais consumidos em todo o mundo, com cerca de uma taxa de aplicação mundial de 150 mil toneladas por ano (MAGGI et al., 2019). Esta substância é o principal ingrediente ativo da classe dos herbicidas fenoxiacéticos, que são herbicidas seletivos pós-emergentes (com ação foliar) que protegem culturas de monocotiledôneas (e.g. trigo, milho, arroz e cana-de-açúcar) de outras espécies de angiospermas (FOLONI, 2016). O herbicida 2,4-D está classificado como um mimetizador de auxinas (HRAC, 2022). Os mimetizadores de auxinas “imitam” as auxinas naturais que agem como reguladoras do crescimento das plantas. A consequência é o crescimento anormal com uma desordem na divisão celular, destruição dos tecidos vasculares e morte das plantas. Outra consequência da ação de 2,4-D é a interferência no metabolismo que altera o transporte de nutrientes (MULLISON, 1987). O 2,4-D provoca também elevada produção de radicais

superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que colaboram para o estresse oxidativo e a degradação de proteínas (ROMERO-PUERTAS et al., 2004).

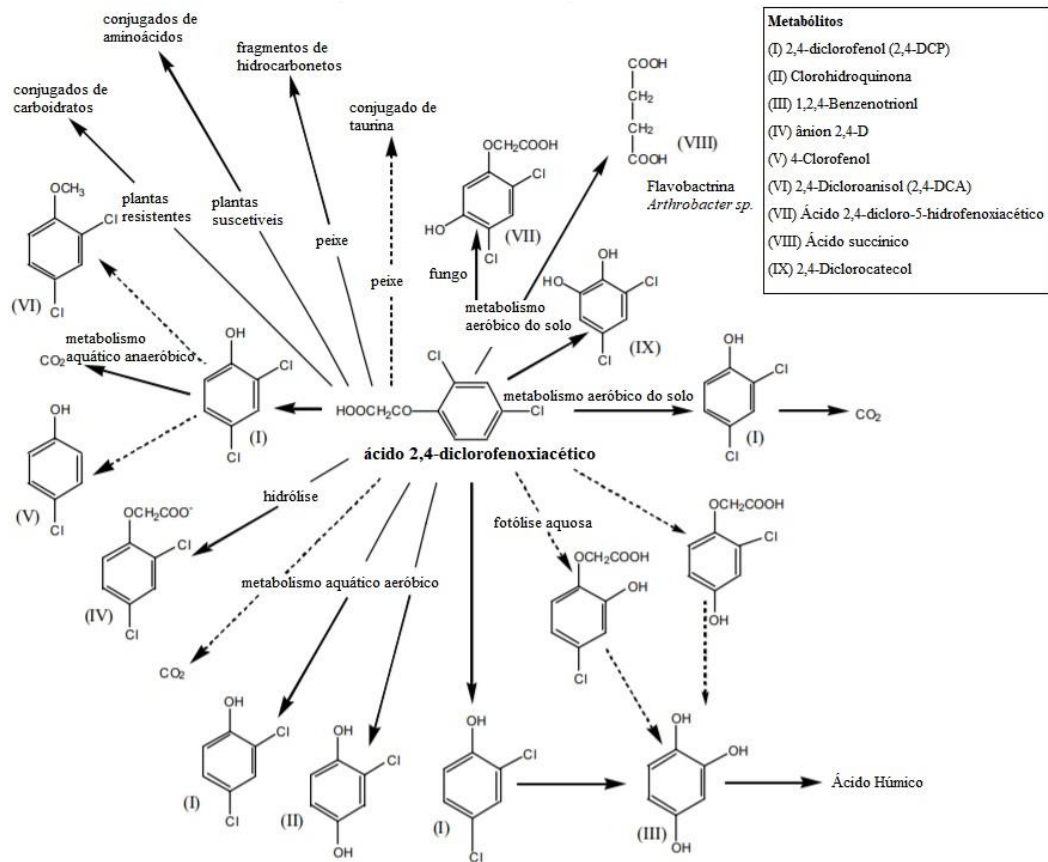
Após aplicado, o herbicida 2,4-D é absorvido rapidamente pelas plantas, em um período entre uma e quatro horas, passando pelas partes da planta responsáveis pelo transporte da água e nutrientes, até acumular na zona responsável pelo crescimento, onde se inicia o processo de morte dos tecidos (FOLONI, 2016).

Com relação ao comportamento ambiental, no solo o herbicida 2,4-D pode ser degradado por microrganismos (ROMAN et al., 2007) sendo esta uma via significativa de degradação do produto, provavelmente pelo uso de seus metabólitos como substrato (TU, 1994). Outros aspectos importantes para a degradação no solo são: umidade, matéria orgânica (maior disponibilidade de ambos favorece a sorção ao solo e a degradação microbiológica), textura do solo (solos argilosos dificultam a locomoção de 2,4-D no solo), pH e temperatura (ambos em faixas ótimas para o crescimento da microbiota favorecem a degradação de 2,4-D) (FOLONI, 2016). No solo, o herbicida 2,4-D possui persistência moderada com dissipação no campo de 59,3 dias, meia-vida aeróbica de 66 dias, meia-vida de hidrólise de 39 dias (JOTE, 2019) e meia-vida em condições anaeróbicas entre 22 e 38 dias (EFSA, 2004).

Na água, o herbicida 2,4-D é encontrado principalmente na forma de ânion livre após as formulações sofrerem hidrólise, o que ocorre rapidamente (cerca de um dia), sendo que esta hidrólise é dependente do pH (GHASSEMI et al., 1981). A degradação na água é geralmente microbiana (aeróbia e anaeróbia) e por fotólise. A biodegradação é dependente da concentração de 2,4-D no meio e do nível de nutrientes, oxigênio e temperatura para manter as populações degradantes (HOWARD, 1991). A meia-vida ( $DT_{50}$ ) na água (25 °C) para hidrólise é 39 dias, fotólise de 13 dias, degradação aeróbia de 15 dias e anaeróbia de 312 dias (JOTE, 2019). Em águas subterrâneas, a presença do herbicida é dependente do solo. Solos arenosos, com pouca matéria orgânica e com granulação grossa podem facilitar este acesso (HOWARD, 1991). As vias de degradação do herbicida 2,4-D estão apresentadas na Figura 2.



**Figura 2.** Vias de degradação do herbicida 2,4-D



**Fonte:** adaptado de Johanna Walters (2022)

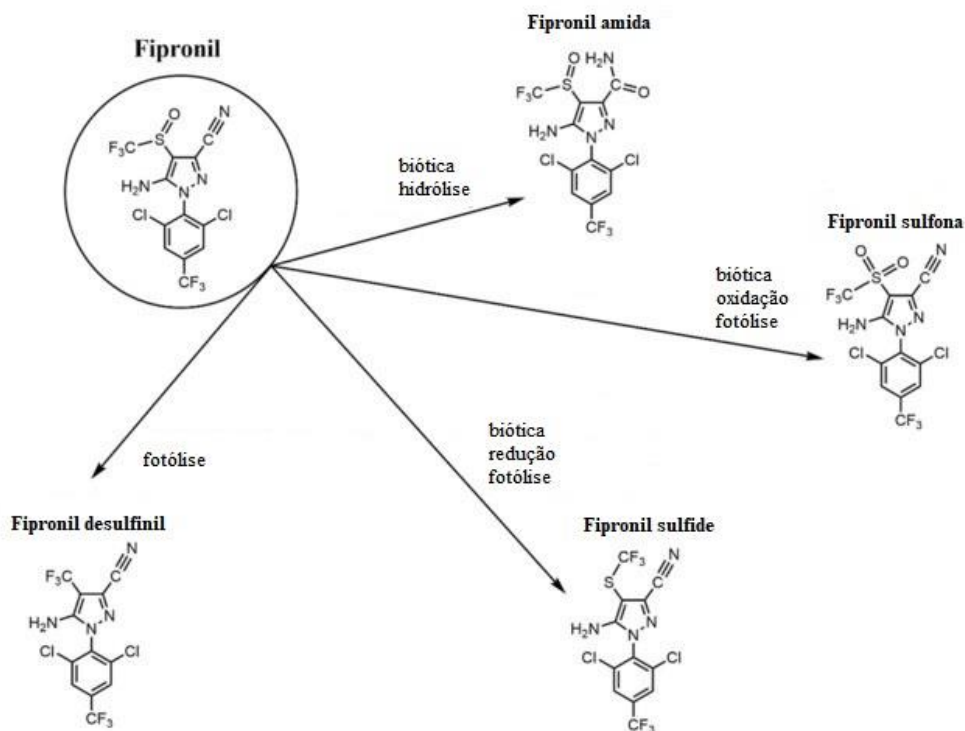
O inseticida fipronil [5-amino-3-ciano-1-(2, 6-dicloro 4 trifluorometilfenil) -4-trifluorometil sulfinil pirazol], comparado ao 2,4-D, é uma molécula relativamente nova, com sua descoberta em 1987 e seu primeiro registro para uso em 1996 pelo grupo francês Rhône-Poulenc (TINGLE et al., 2003). É um inseticida de amplo espectro, que assim como 2,4-D é o mais utilizado do seu grupo, os fenilpirazóis. Fipronil é um inseticida de contato ou ingestão que tem como mecanismo de ação o bloqueio de canais de cloro mediados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). O GABA é um neurotransmissor de inibição presente no sistema nervoso central que tem importante papel na regulação dos sinais elétricos das células nervosas (sinapses). Bloqueadores como o fipronil, entram nos canais de cloro e ficam aprisionados no interior dos poros, bloqueando o fluxo de íons (POZEBON; ARNEMANN, 2020). Sem o fluxo de íons, a inibição do sistema não ocorre, levando a hiperexcitação, convulsões, paralisia e consequente morte dos insetos (GANT et al., 1998).

No caso de seu comportamento ambiental, fipronil e seus metabólitos adsorvem fortemente às partículas do solo, fator que leva a alta persistência neste compartimento (RAVETON et al.,

2007). A degradação de fipronil possui basicamente quatro caminhos: redução, oxidação, hidrólise ou fotólise, com formação dos metabólitos fipronil sulfeto, fipronil sulfona, fipronil amida e fipronil desulfenil, respectivamente (Figura 3) (SINGH et al., 2021). A degradação ocorre principalmente por microrganismos e por fotólise, sendo que assim como a microbiota que degrada 2,4-D, favoráveis condições físicas e químicas do ambiente são importantes reguladoras da degradação do inseticida, como por exemplo, pH, nível de matéria orgânica, oxigênio, umidade e disponibilidade de luz (MAGALHÃES et al., 2018). A meia-vida ( $DT_{50}$ ) de fipronil no solo pode variar entre 122 e 128 em condições de laboratório e de três a sete meses em condições de campo (BONMATIN et al., 2015).

Para a água, a degradação de fipronil também pode apresentar os quatro meios citados para o solo. A presença dos quatro metabólitos na água já foi descrita na literatura (Figura 3). No entanto, na presença de luz solar, a via de degradação mais frequente é a fotólise, com isso, fipronil desulfenil é descrito como o principal metabólito presente na água, com pouca concentração dos outros três (GUNASEKARA et al., 2007). A meia-vida ( $DT_{50}$ ) de fipronil na água depende da via de degradação, sendo em poucas horas no caso da fotólise ( $DT_{50} = 3,6$  horas) ou meses, como na degradação anaeróbica ( $DT_{50}$  médio = 123 dias) (TINGLE et al., 2003).

**Figura 3.** Vias de degradação do inseticida fipronil



**Fonte:** adaptado de Zhe Zhou et al. (2021)

Ambos os ingredientes ativos (2,4-D e fipronil) já tiveram sua presença reportada em ecossistemas naturais próximos às culturas agrícolas no Brasil, estando presentes também em noticiários por incidentes de perdas de vinhedos (culturas de uvas) pela deriva de 2,4-D (ROLLSING, 2021) e morte de centenas de abelhas no caso de fipronil (GRIGORI; FONSECA, 2019).

Grützmacher et al. (2008) detectaram a presença de fipronil em sete amostras de rios de uma região próxima a cultivos de arroz, com concentração máxima de 380 vezes o limite de detecção do método utilizado. Marchesan et al. (2010) relataram concentrações de 2,4-D entre 3 e 3,4 µg/L e de 0,05 a 26,2 µg/L de fipronil em rios próximos a lavouras no sul do país, em duas safras diferentes.

No estado de São Paulo, o órgão fiscalizador ambiental do estado (CETESB), realizou um monitoramento em 2017 e detectou o ingrediente ativo fipronil em 75 % das amostras de água, enquanto o 2,4-D estava presente em 14 % (CETESB 2018). Esta avaliação foi realizada em sete pontos amostrais, em seis diferentes corpos d'água, com 176 amostras coletadas para análise de agrotóxicos. As concentrações máximas encontradas para os dois agrotóxicos foram de 2,4 a 465 µg/L para o fipronil e de 143,1 a 366,6 µg/L para o 2,4-D.

Nos três estudos citados foram relatadas concentrações superiores aos critérios de qualidade ambiental de 0,2 µg/L para 2,4-D e 0,012 µg/L para fipronil (ALBUQUERQUE et al., 2016). Sendo assim, é relevante a avaliação da toxicidade destes ingredientes ativos no notável cenário agrícola brasileiro. Além dos agrotóxicos, no caso da cana-de-açúcar, outro resíduo importante para a análise dos impactos é a vinhaça.

#### **2.4. O uso da vinhaça da cana-de-açúcar como fertilizante: vantagens e desvantagens**

A vinhaça é o resíduo da destilação do caldo da cana-de-açúcar para obtenção do etanol. Este resíduo tem como característica a cor marrom-escuro, odor forte, baixo pH, alta corrosividade, alto teor de potássio e demanda biológica de oxigênio (DBO) (SILVA; BONO; PEREIRA, 2014). Estima-se que para cada litro de álcool produzido são gerados 10 litros de vinhaça (FERRAZ; PRADA; PAIXÃO, 2000). Pensando na expectativa para a próxima safra de cana-de-açúcar para a produção de etanol (CONAB, 2021), serão mais de 240 bilhões de litros de vinhaça gerados em 1 ano, o que equivale a 96 mil piscinas olímpicas.

Este resíduo por muitos anos foi lançado de forma não controlada em corpos d'água e solos. Atualmente, as formas alternativas de lidar com o grande volume da vinhaça gerada são seu

uso na fertirrigação, produção de ração animal, produção de proteína, compostagem e geração de energia através da digestão anaeróbia (MARINHO et al., 2016).

A utilização da vinhaça como fertilizante na fertirrigação (processo que usa a água da irrigação para distribuir o adubo no cultivo) iniciou na década de 50 após os estudos de Almeida (ALMEIDA, 1952). Dentre as vantagens desta função para a vinhaça, além da destinação de este volume enorme de resíduo ter uma aplicabilidade, pode-se citar: praticidade e economia para os produtores, por necessitar de pouco investimento inicial para a aplicação que possui uma grande relação custo-benefício com a manutenção da aplicação a longo prazo, enriquecimento de solos com baixa fertilidade e consequente melhora da produção e crescimento das plantas (CORTEZ; MAGALHÃES; HAPPI, 1992).

Com relação as desvantagens, se aplicada em altas doses, a vinhaça pode prejudicar a qualidade do cultivo da cana-de-açúcar, provocar salinização do solo, contaminação do lençol freático e lixiviação de nutrientes para corpos d'água e solos naturais próximos da lavoura (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). Como consequência disso, no solo pode ocorrer o elevado aumento de microrganismos, e na água tem-se a eutrofização, o aumento da turbidez, a redução do oxigênio dissolvido, anoxia e mortandade de peixes e outros integrantes da fauna e flora aquática (BALLESTER et al., 1999; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2005).

Neste sentido, como a vinhaça é um importante resíduo de uma das maiores indústrias do país, é importante avaliar a potencialidade tóxica dela juntamente com os agrotóxicos, sendo assim, inclui-la nas avaliações ambientais e ecotoxicológicas em regiões de grandes lavouras de cana-de-açúcar como o estado de São Paulo é sem dúvida essencial.

## **2.5. A ecotoxicologia como instrumento na avaliação de impactos ambientais**

A ecotoxicologia é a ciência que procura compreender os efeitos tóxicos provocados por substâncias químicas e biológicas, sejam elas de origem natural ou antropogênicas e os processos biológicos envolvidos nos efeitos. Esta ciência leva em conta a diferença na sensibilidade das espécies-teste, doses, tempo de exposição e toxicidade das diferentes substâncias. Resumidamente, seu objetivo é entender e prever os efeitos das substâncias em seres vivos, comunidades e ecossistemas (CHAPMAN, 2006). Desde a década de 80, a ecotoxicologia assume um papel importante na regulamentação de substâncias químicas, como por exemplo, os agrotóxicos, através de testes ecotoxicológicos padronizados, desenvolvidos por agências como a US EPA e OECD (MAGALHÃES D.P & FERRÃO FILHO A. S, 2008).

No Brasil, a ABNT é responsável pelo desenvolvimento de normas padronizadas usadas no país, como para algas, cladóceros e peixes (ABNT, 2016, 2017, 2018). O IBAMA, por outro lado, é o responsável pela análise, registro e controle de agrotóxicos, seus componentes e afins (IBAMA, 2021). Os testes atualmente requeridos para a avaliação de agrotóxicos, segundo o IBAMA (2017), são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Relação de estudos de toxicidade requeridos para agrotóxicos\*

Código do Protocolo		Estudo	Tipo do Produto
OECD	US EPA		
216/217	850.3200	Microrganismos (Ciclo do carbono e nitrogênio)	PT e PF
201	850.4500	Algas	PT e PF
207/222	850.6200	Organismos do solo	PT e PF
213/214	850.3020	Abelhas (oral ou contato)	PT e PF
202	850.1010	Microcrustáceos agudo	PT e PF
211	850.1300	Microcrustáceos crônico	PT
203	850.1075	Peixes agudo	PT e PF
210	850.1400	Peixes crônico	PT
223	850.2100	Aves (dose única)	PT e PF
205	850.2200	Aves (dieta)	PT
206	850.2300	Aves (reprodução)	PT
208/227	850.4100/850.4150	Fitotoxicidade para plantas não-alvo	PT e PF
420/423/425	870.1100	Toxicidade oral aguda para ratos (mamíferos)	PT e PF
416	870.3800	Efeitos sobre reprodução e prole em duas gerações sucessivas (mamíferos)	PT

\*Adaptado de IBAMA (2017)

PT – Produto técnico

PF – Produto formulado

Os testes ecotoxicológico apresentados na Tabela 2 são importantes fontes de informações para a elaboração das diretrizes que sustentam as leis ambientais, além da fácil execução, baixo custo e replicabilidade. No entanto, por serem testes laboratoriais individuais, eles são limitantes no que se refere à representatividade ambiental, já que nos ecossistemas naturais

existe uma série de fatores que pode influenciar na toxicidade das substâncias para todas as espécies.

Neste sentido, os estudos ecotoxicológicos na última década voltaram-se para a avaliação de efeitos em nível de comunidade e ecossistema (e.g. SCHMITT-JANSEN; ALTENBURGER, 2008; ROTTER et al., 2011). Estes estudos são realizados tanto em laboratório em escala menor, chamados microcosmos, como no ambiente através de sistemas artificiais (mesocosmos) ou naturais (*in situ*) (BÁCSI et al., 2013; CADMUS et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2017). Enquanto os modelos laboratoriais são ambientes com as características manipuláveis, os sistemas artificiais ou modelos ecossistêmicos, denominados mesocosmos, integram diversos fatores bióticos e abióticos, aproximando-se mais da realidade natural dos ecossistemas (VAN DEN BRINK et al., 2005). Através de experimentos em mesocosmos pode-se avaliar a estrutura do ecossistema a partir da análise da composição e densidade das populações e comunidades (MENDES, 2015). Isso é possível porque o equilíbrio de um ecossistema só é garantido pelo bom desempenho das funções executadas pelos diferentes componentes da cadeia trófica. Sendo assim, qualquer fator que desestruture uma população ou comunidade poderá influenciar nos demais níveis e desestabilizar o ecossistema como um todo (DE GROOT; WILSON; BOUMANS, 2002).

Existem diversos fatores que determinam as populações e comunidades que podem integrar um sistema, como por exemplo, as características físicas e químicas, disponibilidade de alimento/hábitos alimentares, competição e predação. Além de fatores naturais, os fatores antrópicos, como a exposição a contaminantes tóxicos, também podem modificar a estrutura e o funcionamento dos sistemas aquáticos (HANAZATO, 1998). Exemplos disso são os agrotóxicos, com uma série de trabalhos que já aplicaram modelos ecossistêmicos para explicar danos estruturais e funcionais nos sistemas aquáticos (e.g. VIEIRA, 2010; NOVELLI et al., 2012; MENDES, 2015; SHINN et al., 2015). Neste sentido, aliados às avaliações em nível laboratorial, os estudos baseados em modelos ecossistêmicos podem ser uma boa estratégia para uma melhor compreensão dos riscos ecológicos decorrentes do aporte de agrotóxicos. Além disso, é possível integrar outras avaliações laboratoriais que não sejam apenas baseadas em efeitos letais, como por exemplo, as avaliações comportamentais, como atividade natatória (BRIDI et al., 2017) e alimentação (MCWILLIAM; BAIRD, 2002); morfológicas, que analisam alterações na forma e tamanho dos organismos (HANAZATO, 1991); e fisiológicas, tais como reprodução (GOTTARDI et al., 2017), garantindo melhor robustez na interpretação dos efeitos destas substâncias.

## Referências

AGROFIT (2020) **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário**. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 28/07/2020.

ABNT. NBR 15088 (2016): **Toxicidade Aguda: Teste com peixes**. Disponível em: <http://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=86373>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

ABNT (2017). Ecotoxicologia aquática - **Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**. Disponível em: <https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=368529>>.

ABNT. Ecotoxicologia aquática - **Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*)**. Disponível em: <https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=391089>>.

ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian Freshwaters: A Critical Review. **Environmental Science. Processes & Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 13 jul. 2016.

ALMEIDA, J. R. O problema da vinhaça em São Paulo. Piracicaba, São Paulo: **Boletim do Instituto Zimotécnico**, 1952.

BÁCSI, I. et al. Laboratory and Microcosm Experiments Testing the Toxicity of Chlorinated Hydrocarbons on a Cyanobacterium Strain (*Synechococcus* PCC 6301) and on Natural Phytoplankton Assemblages. **Hydrobiology**, v. 710, n. 1, p. 189–203, 1 jun. 2013.

BALLESTER, M. V. et al. Effects of increasing organic matter loading on the dissolved O<sub>2</sub>, free dissolved CO<sub>2</sub> and respiration rates in the Piracicaba River basin, Southeast Brazil. **Water Research**, v. 33, n. 9, p. 2119–2129, 1 jun. 1999.

BONMATIN, J.-M. et al. Environmental Fate and Exposure; Neonicotinoids and Fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35–67, 2015.

BRIDI, D. et al. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behaviour in zebrafish. **Toxicology**, v. 392, p. 32–39, 2017.

CADMUS, P. et al. The Use of Field and Mesocosm Experiments to Quantify Effects of Physical and Chemical Stressors in Mining-Contaminated Streams. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 14, p. 7825–7833, 19 jul. 2016.

CARNEIRO, F. F. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **Expressão Popular**, 2015. Disponível em: <https://abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

CETESB, C. A. do estado de S. P. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017**. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2018/06/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-das-%C3%81guas-Interiores-no-Estado-de-S%C3%A3o-Paulo-2017.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

CHAPMAN, P. M. Emerging Substances--Emerging Problems? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1445–1447, jun. 2006.

CONAB, C. N. de A. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, 2021**. Disponível em: <[https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/39835\\_2a34b37eec6ef5d4dac107978bb0103d](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/39835_2a34b37eec6ef5d4dac107978bb0103d)>. Acesso em: 19 fev. 2022.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia** v. 2, n. 2, p. 17, 1992.

DE GROOT, R. S.; WILSON, M. A.; BOUMANS, R. M. J. A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. **Ecological Economics**, v. 41, n. 3, p. 393–408, 1 jun. 2002.

EFSA, E. F. S. A. **Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2,4-D**. v. 12(9):3812, p. 81, 2014.

FAO, O. das N. U. para A. e A. **Anuário estatístico mundo alimentação e agricultura 2021**. Disponível em: <[https://www.fao.org/3/cb4477en/online/cb4477en.html#chapter-1\\_3](https://www.fao.org/3/cb4477en/online/cb4477en.html#chapter-1_3)>. Acesso em: 19 fev. 2022.

FERRAZ, J. M. G.; PRADA, L. S.; PAIXÃO, M. A. Certificação Socioambiental do Setor Sucroalcooleiro. **Embrapa Meio Ambiente** ed. 1 Â Jaguariúna, 2000.

FIOCRUZ, F. O. C. **Agrotóxicos e Saúde - Coleção Saúde, Ambiente e Sustentabilidade**.

Série Fiocruz, 2018. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/32385/2/02agrotoxicos.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

FOLONI, L. L. **O herbicida 2,4-D uma visão geral**. LabCom Comunicação Total ed. 1, 2016.

GANT, D. et al. Fipronil: Action at the GABA Receptor. **Reviews in Toxicology** 2, p. 147–156, 1998.

GHASSEMI, M. et al. **Environmental Fates and Impacts of Major Forest Use Pesticides**. US EPA, 1981. Disponível em: <<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=9101M9PQ.TXT>>. Acesso em: 27 fev. 2022.

GOTTARDI, M. et al. The effects of epoxiconazole and A-cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction, and offspring size. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 2155–2166, 2017.

GRANDIS, A.; PALACIOS, C.; BUCKERIDGE, M. S. **O desenvolvimento da agricultura no Brasil e as perspectivas para uma agricultura sustentável no século XXI, 2022**. Disponível em: <[https://crbio01.gov.br/media/view/2020/12/sustentabilidade\\_e\\_agricultura\\_no\\_brasil\\_no\\_seculo\\_xxi\\_2126.pdf](https://crbio01.gov.br/media/view/2020/12/sustentabilidade_e_agricultura_no_brasil_no_seculo_xxi_2126.pdf)>. Acesso em: 26 fev. 2022.



GRIGORI, P.; FONSECA, B. **Apicultores brasileiros encontram meio bilhão de abelhas mortas em três meses**. Disponível em: <<https://revistagalileu.globo.com/Ciencia/Meio-Ambiente/noticia/2019/05/apicultores-brasileiros-encontram-meio-bilhao-de-abelhas-mortas-em-tres-meses.html>>. Acesso em: 28 fev. 2022.

GRÜTZMACHER, D. D. et al. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, p. 632–637, dez. 2008.

GUNASEKARA, A. S. et al. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 3, p. 189–199, 2007.

HANAZATO, T. Pesticides as Chemical Agents Inducing Helmet Formation in *Daphnia ambigua*. **Freshwater Biology**, v. 26, n. 3, p. 419–424, dez. 1991.

HANAZATO, T. Response of a zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of freshwater communities. **Environmental Pollution**, v. 101, n. 3, p. 361–373, 1 jun. 1998.

HOWARD, P. H. **Handbook of Environmental Fate and Exposure Data For Organic Chemicals**. Lewis Publishers CRC Press, 1991. v. 3

HRAC, H. R. A. C. **Global Herbicide Classification Lookup**. Disponível em: <<https://hracglobal.com/tools/classification-lookup>>. Acesso em: 26 fev. 2022.

IBAMA. **Anexo IV portaria 84, 2017**. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/avaliacao/2017/2017-07-25-anexo\\_iv\\_portaria\\_84\\_tabela\\_ilustrativa.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/avaliacao/2017/2017-07-25-anexo_iv_portaria_84_tabela_ilustrativa.pdf)>. Acesso em: 26 fev. 2022.

IBAMA. **Avaliação ambiental para registro de agrotóxicos, seus componentes e afins de uso agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/avaliacao-e-destinacao/quimicos-e-biologicos/avaliacao-ambiental-para-registro-de-agrotoxicos-seus-componentes-e-afins-de-uso-agricola>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

IBGE, I. B. de G. e for. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola.html?=&t=downloads>>. Acesso em: 26 fev. 2022.

IEA. **Relação de trocas entre defensivos e produtos agrícolas**. Instituto de Economia Agrícola, 2016. Disponível em: <<http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/RelaTroca.aspx>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

JOTE, C. A. A Review of 2,4-D Environmental Fate, Persistence and Toxicity Effects on Living Organisms. **Organic & Medicinal Chemistry International Journal**, v. 9, n. 1, p. 22–32, 2019.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, p. 518–534, jun. 2018.

MAGALHÃES D.P & FERRÃO FILHO A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Fundação Oswaldo Cruz** v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.

MAGALHÃES, J. et al. Fipronil: Uses, pharmacological and toxicological features. **Revinter**, v. 11, n. 1, p. 67–83, 2018.

MAGGI, F. et al. PEST-CHEMGRIDS, Global Gridded Maps of the Top 20 Crop-Specific Pesticide Application Rates from 2015 to 2025. **Scientific Data**, v. 6, n. 1, p. 170, 12 set. 2019.

MARCHESAN, E. et al. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053–1059, maio 2010.

MARINHO, F. B. et al. Resíduo da agroindústria sucroalcooleira – vinhaça. **Educação Ambiental em Ação**, v. XV, n. 58, 27 nov. 2016. Disponível em: <[http://www.revistaea.org/logo\\_fb.png](http://www.revistaea.org/logo_fb.png)>. Acesso em: 1 mar. 2022.

MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. Plankton richness in a eutrophic reservoir (Barra Bonita Reservoir, SP, Brazil). In: Aquatic Biodiversity II. **Developments in Hydrobiology**. Springer, Dordrecht, 2005. p. 367–378.

MCWILLIAM, R. A.; BAIRD, D. J. Postexposure Feeding Depression: New Toxicity Endpoint for Use in Laboratory Studies with *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1198–1205, jun. 2002.

MENDES, L. B. **O uso de modelos ecossistêmicos e experimentos laboratoriais para avaliação dos efeitos do agrotóxico Mythos® (i.e., pyrimethanil) em ecossistemas aquáticos**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-18022016-130207/>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

MIRANDA, R. Breve História da Agropecuária Brasileira. In: **Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 1p. 2.171.

MORAES, R. F. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos — **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada** – Ipea, 2019. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/agrotoxicos/relatorio\\_nacional\\_vigilancia\\_populacoes\\_expostas\\_agrotoxicos.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/agrotoxicos/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf/view)>. Acesso em: 19 fev. 2022.

MULLISON, W. R. **Environmental fate of phenoxy herbicides**. University of California, 1987. Disponível em:

<[https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Environmental+fate+of+phenoxy+herbicides&author=Mullison%2C+W.R.&publication\\_year=1987](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Environmental+fate+of+phenoxy+herbicides&author=Mullison%2C+W.R.&publication_year=1987)>. Acesso em: 26 fev. 2022.

NOVELLI, A. et al. Field and Laboratory Studies to Assess the Effects of Vertimec<sup>®</sup> 18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, n. 1, p. 87–93, jan. 2012.

OECD/FAO (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico/Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) (2019), OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028, **OECD Publishing**, Paris. doi.org/10.1787/agr\_outlook-2019-en.

POZEBON, H.; ARNEMANN, J. A. **Como funcionam os inseticidas ciclodienos e fenilpirazóis?** 2020. Disponível em: <<https://maissoja.com.br/como-funcionam-os-inseticidas-ciclodienos-e-fenilpirazois/>>. Acesso em: 27 fev. 2022.

PRADO JÚNIOR, C. História econômica do Brasil. São Paulo: **Brasiliense**, 1990.

RANI, L. et al. An Extensive Review on the Consequences of Chemical Pesticides on Human Health and Environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 283, p. 124657, 2021.

RAVETON, M. et al. Soil Distribution of Fipronil and Its Metabolites Originating from a Seed-Coated Formulation. **Chemosphere**, v. 69, n. 7, p. 1124–1129, 2007.

ROLLSING. **Denúncias de deriva do 2,4-D caem, mas produtores de uva continuam sofrendo perdas.** Disponível em: <<https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2021/12/denuncias-de-deriva-do-24-d-caem-mas-produtores-de-uva-continuam-sofrendo-perdas-ckxs217s600b101889eaqu2b0.html>>. Acesso em: 28 fev. 2022.

ROMAN, E. S. et al. Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação. Berthier ed. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 2007. v. 1

ROMERO-PUERTAS, M. C. et al. Reactive Oxygen Species-Mediated Enzymatic Systems Involved in the Oxidative Action of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid\*. **Plant, Cell & Environment**, v. 27, n. 9, p. 1135–1148, 2004.

ROTTER, S. et al. Active bio-monitoring of contamination in aquatic systems—An in-situ translocation experiment applying the PICT concept. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 228–236, 17 jan. 2011.

SALATI, P. **Liberação de agrotóxicos em 2021 bate novo recorde na série histórica; maioria é genérico.** Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2021/12/06/liberacao-de-agrotoxicos-em-2021-bate-novo-recorde-na-serie-historica-maioria-e-generico.ghtml>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

SCHMITT-JANSEN, M.; ALTENBURGER, R. Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation PAM fluorometry. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 49–58, 20 jan. 2008.

SHINN, C. et al. Immediate and Mid-Term Effects of Pyrimethanil Toxicity on Microalgae by Simulating an Episodic Contamination. **Chemosphere**, v. 120, p. 407–413, fev. 2015.

SILVA, A. P. M. da; BONO, J. A. M.; PEREIRA, F. de A. R. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 38–43, jan. 2014.

SILVA, M. A. S. da; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108–114, fev. 2007.

SINGH, N. S. et al. A Comprehensive Review of Environmental Fate and Degradation of Fipronil and Its Toxic Metabolites. **Environmental Research**, v. 199, p. 111316, Agosto 2021.

TINGLE, C. C. D. et al. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 176, p. 1–66, 2003.

TU, C. M. Effects of Herbicides and Fumigants on Microbial Activities in Soil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology** (USA), 1994. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00205132.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2022.

US EPA, U. S. environmental P. A. **Types of Pesticide Ingredients**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/types-pesticide-ingredients>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

VAN DEN BRINK, P. J. et al. The Use of Terrestrial and Aquatic Microcosms and Mesocosms for the Ecological Risk Assessment of Veterinary Medicinal Products. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 820–829, 1 abr. 2005.

VASCONCELOS, A. M. et al. Survival and Development of Bullfrog Tadpoles in Microcosms Treated with Abamectin. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 6, p. 729–737, ago. 2017.

VIEIRA, BH. **Efeitos do agrotóxico Vertimec no fitoplâncton: um estudo laboratorial and “in situ”**. Escola de Engenharia de São Carlos: Universidade de São Paulo, 2010.

WALTERS, J. **Environmental Fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid**. Department of Pesticide Regulation - Environmental Monitoring and Pest Management, 2022. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.639.4289&rep=rep1&type=pdf#:~:text=Plants%20absorb%20%2C4%2DD,are%20absorbed%20by%20the%20plant.>>. Acesso em: 27 fev. 2022.

ZHOU, Z. et al. Biodegradation of Fipronil: Current State of Mechanisms of Biodegradation and Future Perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 20, p. 7695–7708, out. 2021.

### 3. OBJETIVOS E HIPÓTESES

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da contaminação ambiental da vinhaça e de agrotóxicos utilizados na produção da cana-de-açúcar sobre três organismos integrantes da cadeia trófica aquática de ambientes tropicais através de testes laboratoriais e modelos ecossistêmicos (mesocosmos).

#### 3.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar os efeitos da vinhaça e dos agrotóxicos DMA<sup>®</sup> 806 BR e Regent<sup>®</sup> 800 WG, isolados e em mistura, na alga cosmopolita *Raphidocelis subcapitata* por meio de testes laboratoriais e modelos ecossistêmicos (mesocosmos).
- II. Avaliar os efeitos letais e subletais da vinhaça e dos agrotóxicos DMA<sup>®</sup> 806 BR e Regent<sup>®</sup> 800 WG, isolados e em mistura, no cladóceros nativo *Ceriodaphnia silvestrii*, por meio de testes laboratoriais e modelos ecossistêmicos (mesocosmos).
- III. Avaliar os efeitos letais e subletais da vinhaça e dos agrotóxicos DMA<sup>®</sup> 806 BR e Regent<sup>®</sup> 800 WG, isolados e em mistura, no peixe tropical *Danio rerio*, por meio de testes laboratoriais e modelos ecossistêmicos (mesocosmos).

#### 3.3. Hipóteses

- I. A vinhaça e os agrotóxicos DMA<sup>®</sup> 806 BR e Regent<sup>®</sup> 800 WG, isolados e em mistura, alteram o crescimento da alga *Raphidocelis subcapitata*, bem como o tamanho das células, a complexidade celular e a fluorescência (clorofila *a*).
- II. A vinhaça e os agrotóxicos DMA<sup>®</sup> 806 BR e Regent<sup>®</sup> 800 WG, isolados e em mistura, causam efeitos agudos (mortalidade) e crônicos (reprodução) no cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, interferindo ainda na alimentação da espécie.
- III. A vinhaça e os agrotóxicos DMA<sup>®</sup> 806 BR e Regent<sup>®</sup> 800 WG, isolados e em mistura, causam mortalidade, alterações na alimentação, movimento natatório e morfologia de brânquias do peixe *Danio rerio*.
- IV. As misturas binárias dos agrotóxicos ou ternárias com a adição da vinhaça são mais tóxicas que os compostos avaliados isoladamente.

## 4. DESIGN EXPERIMENTAL

### 4.1. Descrição da instalação e procedimentos

Os experimentos laboratoriais e em modelos ecossistêmicos foram realizados no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), localizado no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais, da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo (EESC/USP), localizado no município de Itirapina, Brasil (22°01'22" S, 43°57'38" W).

Os modelos ecossistêmicos foram montados em recipientes circulares de polipropileno com capacidade de 1500 litros cada (0,83 m de profundidade e 1,43 m de diâmetro do fundo) e foram enterrados a 0,6 m abaixo do nível do terreno. Os mesocosmos receberam 20 cm de solo natural simulando o sedimento (caracterização do solo detalhada em FIGUEIRÊDO et al., 2020) e foram preenchidos com água de poço profundo (coluna d'água 60 cm;  $\pm$  1500 L). Os sistemas foram colonizados com zooplâncton e fitoplâncton coletados na represa do "Broa" (Itirapina, São Paulo) e com amostras de sedimentos não contaminados de outros mesocosmos previamente estabelecidos no CRHEA (ver MOREIRA et al., 2017). Além disso, as espécies de macrófitas *Echhornia crassipes*, *Myriophyllum aquaticum*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia auriculata* foram obtidas no cultivo do departamento de botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e adicionadas a cada mesocosmo para aumentar a complexidade do sistema e estimular a colonização de insetos aquáticos e perifíton.

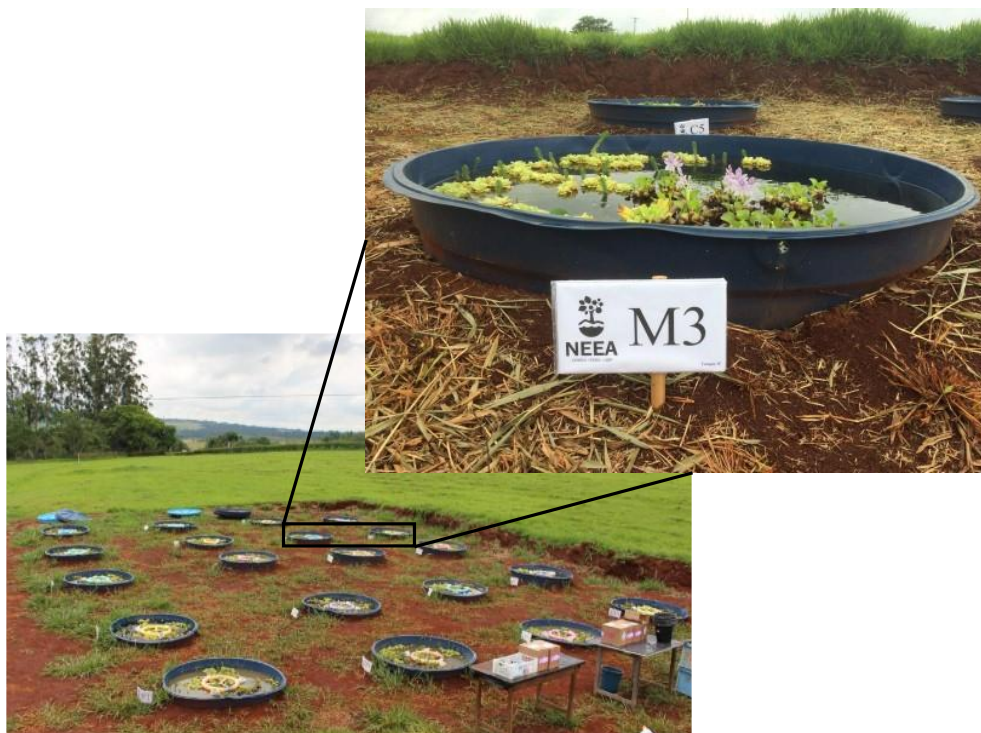
Após seis meses de estabilização, os mesocosmos foram divididos aleatoriamente em seis tratamentos com três repetições para os tratamentos contaminados e cinco para os controles: (1) controle não contaminado (C); (2) herbicida DMA<sup>®</sup> 806 BR (i.a. 2,4-D, Dow AgroSciences Industrial Ltda) (D); (3) inseticida Regent<sup>®</sup> 800 WG (i.a. fipronil, BASF S.A.) (F); (4) mistura de DMA<sup>®</sup> e Regent<sup>®</sup> (M); (5) vinhaça de cana-de-açúcar (V) e (6) mistura dos agrotóxicos com a vinhaça (MV) (Figura 4).

A contaminação dos mesocosmos foi realizada com os controles vedados para impedir a contaminação cruzada dos tratamentos contaminados (Figura 5). Cada tratamento contaminado teve a aplicação das substâncias simultaneamente. A dose aplicada dos agrotóxicos foi baseada nas recomendações para a fase de pré-emergência da cultura da cana-de-açúcar: 3,5 litros de DMA<sup>®</sup> por hectare (correspondente a 2,35 kg de 2,4-D por hectare) e 500 gramas Regent<sup>®</sup> por hectare (correspondente 400 gramas de fipronil por hectare). O cálculo para aplicação assumiu 100 % de pulverização direta (comum nos canaviais brasileiros; PINTO et al., 2021) e considerou o diâmetro superior dos mesocosmos (1,75 m), resultando em uma dose de aplicação de 1 mL DMA<sup>®</sup> (670 miligramas de 2,4-D) e 120 miligramas de Regent<sup>®</sup> (96 miligramas de

fipronil). A partir deste cenário de contaminação e do volume de água de  $\pm 1500$  litros em cada mesocosmo, as concentrações nominais esperadas foram  $447 \mu\text{g/L}$  de 2,4-D e  $64 \mu\text{g/L}$  de fipronil nos tratamentos isolado e nas misturas (M e MV).

No caso da vinhaça, o volume para aplicação foi calculado a partir do que é comumente aplicado pelos agricultores locais (comunicação pessoal). Sendo assim, a partir dos dados de profundidade e área de superfície, foi calculado um volume de 20 litros de vinhaça como volume de aplicação para cada mesocosmo dos tratamentos V e MV, o que correspondeu a uma concentração esperada de vinhaça de 1,3 % (V/V).

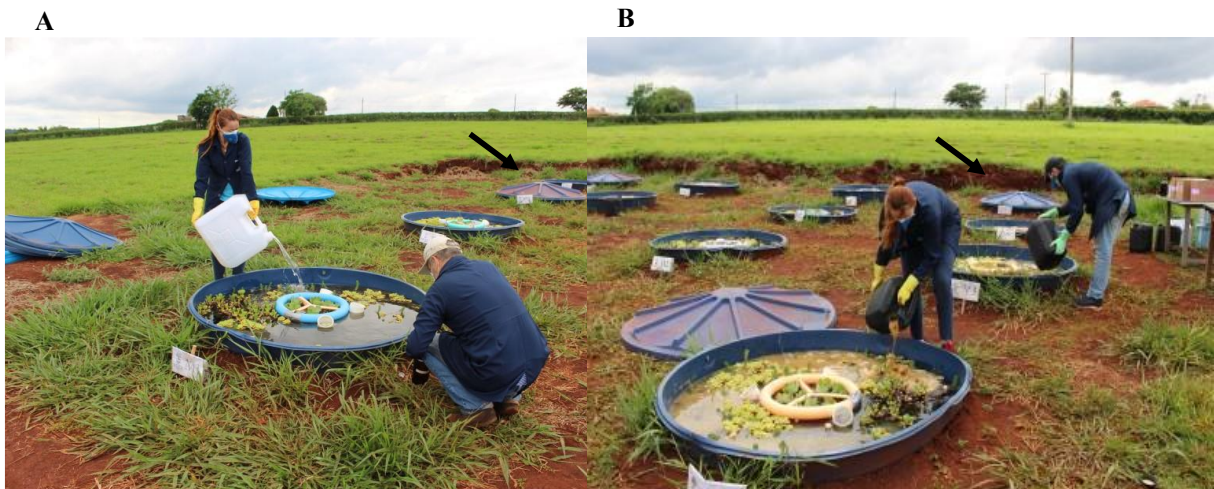
**Figura 4.** Área de estudo em modelos ecossistêmicos



**Fonte:** Allan Pretti Ogura (2018)

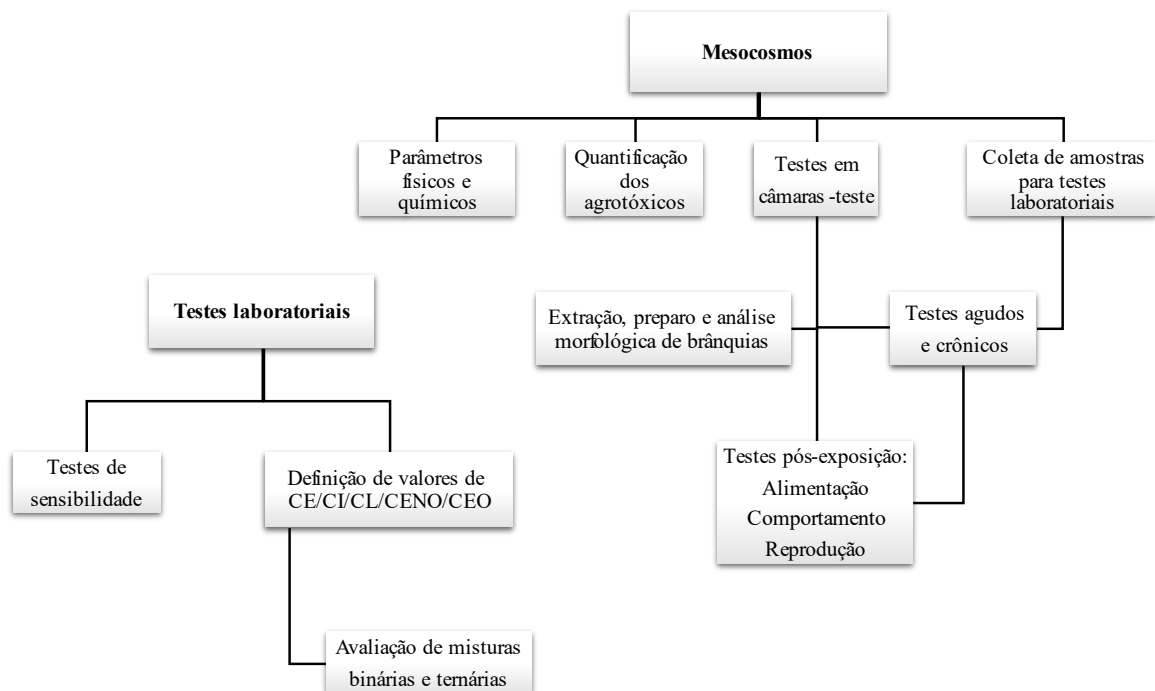
Após a estabilização dos mesocosmos, os testes de toxicidade *in situ* e/ou as coletas de amostras para análises físicas e químicas, quantificação dos agrotóxicos e testes de toxicidade laboratoriais do presente estudo foram realizados em nove tempos amostrais, sendo eles: pré-contaminação (T0), 2 a 3 horas depois da contaminação (T1), 3 dias (T2), 7 dias (T3), 14 dias (T4), 21 dias (T5), 30 dias (T6), 45 dias (T7) e 75 dias (T8) após a contaminação. Um fluxograma das etapas experimentais é apresentado na Figura 6.

**Figura 5.** Contaminação dos mesocosmos utilizados no estudo. (A: inserção dos agrotóxicos em M e B: inserção da vinhaça em V). As setas mostram os controles vedados no momento da contaminação.



Fonte: Allan Pretti Ogura (2018)

**Figura 6.** Fluxograma das etapas experimentais realizadas



## 4.2. Análises químicas

Os resultados das análises químicas são apresentados nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3. Comentários sobre as diferenças obtidas nos tratamentos e a influência nos resultados da toxicidade para as espécies são discutidas nos respectivos capítulos para cada espécie avaliada.



#### 4.2.1. Parâmetros físicos e químicos

Em todas as amostragens, foram obtidos os valores de temperatura (T), pH, condutividade (Cond.), oxigênio dissolvido (OD) e turbidez (Turb.) por meio de uma sonda multiparâmetros (YSI - ProDSS), no mesmo período do dia (entre 8 e 10 da manhã). Os níveis de clorofila *a* (Clor. *a*) também foram mensurados com o fluorímetro Aquafluor<sup>®</sup>. Além disso, amostras de água foram coletadas para a determinação dos teores de nitrogênio total (N), fósforo total (P) e amônio (NH<sub>4</sub>) de cada mesocosmo, com base nas metodologias de APHA et al. (2012), Andersen (1976) e Hansen & Koroleff (1999), respectivamente. As médias por tratamento por coleta de cada um desses parâmetros podem ser visualizadas na Tabela 3. A soma do volume de chuva entre as coletas também é apresentada. Os dados foram obtidos na estação climatológica presente no CRHEA.

**Tabela 3.** Parâmetros físicos e químicos das amostragens dos mesocosmos e dados climatológicos do volume de chuva

Média ± desvio padrão (DP) dos parâmetros de cada amostragem por tratamento											Chuva
	T ± DP	pH ± DP	Cond. ± DP	OD ± DP	Turb. ± DP	Clor. <i>a</i> ± DP	N ± DP	P ± DP	NH <sub>4</sub> ± DP	mm (1L/1m <sup>2</sup> )	
	°C		µs/cm	mg/L	NTU	µg/L	mg/L	µg/L	µg/L	entre amostragens	
<b>T0_C</b>	24 ± 0,3	5,6 ± 0,1	11 ± 1,8	3,9 ± 0,5	2,6 ± 1,5	2,5 ± 2,5	0,5 ± 0,1	90 ± 32	41 ± 27		
<b>T0_D</b>	24 ± 0,3	5,5 ± 0,2	12 ± 2,2	4,0 ± 0,9	3,0 ± 0,9	4,0 ± 3,6	1,0 ± 0,1	148 ± 36	29 ± 6		
<b>T0_F</b>	7 dias antes	24 ± 0,1	5,7 ± 0,3	14 ± 4,2	4,0 ± 1,2	3,8 ± 2,4	5,7 ± 5,0	0,6 ± 0,3	149 ± 32	33 ± 30	T0-T1
<b>T0_M</b>	21/11/2018	23 ± 0,3	5,6 ± 0,3	17 ± 8,7	3,8 ± 0,3	1,8 ± 0,5	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,1	66 ± 51	74 ± 56	72,1
<b>T0_V</b>		24 ± 0,2	6,6 ± 1,1	13 ± 4,3	3,3 ± 1,9	2,5 ± 1,6	14 ± 16	1,2 ± 0,1	90 ± 29	115 ± 18	
<b>T0_MV</b>		24 ± 0,0	5,8 ± 0,0	12 ± 0,0	3,1 ± 0,0	1,3 ± 0,0	3,6 ± 0,0	0,8 ± 0,0	42 ± 0,0	1762 ± 0	
<b>T1_C</b>		25 ± 0,4	4,4 ± 0,2	21 ± 5,3	7,2 ± 0,1	4,3 ± 2,0	5,6 ± 5,5	3,0 ± 5,0	210 ± 122	353 ± 439	
<b>T1_D</b>		25 ± 0,7	4,5 ± 0,1	20 ± 3,5	7,2 ± 0,2	11 ± 7,5	17 ± 9,2	0,9 ± 0,7	311 ± 161	144 ± 55	
<b>T1_F</b>	dia da contaminação	25 ± 0,8	4,4 ± 0,4	23 ± 3,5	7,2 ± 0,2	4,9 ± 3,9	5,1 ± 4,6	1,0 ± 0,1	287 ± 126	97 ± 29	T1-T2
<b>T1_M</b>	26/11/2018	24 ± 0,6	4,3 ± 0,4	26 ± 8,5	7,3 ± 0,2	6,0 ± 4,9	3,2 ± 1,2	1,0 ± 0,3	190 ± 21	151 ± 28	1,6
<b>T1_V</b>		24 ± 0,2	3,6 ± 0,5	303 ± 41	7,0 ± 0,3	314 ± 69	163 ± 30	15,5 ± 14	1133 ± 228	221 ± 160	
<b>T1_MV</b>		25 ± 0,6	3,3 ± 0,1	275 ± 103	7,0 ± 0,2	444 ± 58	134 ± 7	15,4 ± 3	1352 ± 179	369 ± 33	
<b>T2_C</b>		24 ± 0,2	6,0 ± 0,1	30 ± 3,4	2,0 ± 0,7	15 ± 6,1	6,5 ± 9,8	0,7 ± 0,3	132 ± 53	2,6 ± 0,8	
<b>T2_D</b>		24 ± 0,5	6,0 ± 0,1	34 ± 6,1	1,6 ± 0,8	21 ± 12	5,0 ± 5,0	1,3 ± 0,5	169 ± 41	2,4 ± 0,4	
<b>T2_F</b>	3 dias após	23 ± 0,1	6,0 ± 0,3	34 ± 4,9	2,1 ± 1,6	32 ± 12	5,6 ± 4,9	1,0 ± 0,1	200 ± 81	3,1 ± 0,9	T2-T3
<b>T2_M</b>	29/11/2018	23 ± 0,2	6,1 ± 0,3	39 ± 11	1,9 ± 1,0	20 ± 13	11 ± 11	1,7 ± 1,4	269 ± 124	2,6 ± 1,2	34,5
<b>T2_V</b>		22 ± 0,2	4,7 ± 0,1	442 ± 27	0,3 ± 0,1	198 ± 20	46 ± 15	10,7 ± 3,1	1459 ± 39	2,2 ± 0,0	
<b>T2_MV</b>		23 ± 0,3	4,7 ± 0,0	440 ± 20	0,2 ± 0,1	214 ± 26	61 ± 10	10,7 ± 6,0	1518 ± 52	2,3 ± 0,2	
<b>T3_C</b>		22 ± 0,3	5,9 ± 0,1	31 ± 3,8	1,7 ± 0,4	23 ± 17	4,1 ± 3,0	1,5 ± 0,6	151 ± 68	2,6 ± 0,6	
<b>T3_D</b>		22 ± 0,7	5,9 ± 0,2	35 ± 5,0	1,6 ± 0,7	27 ± 14	23 ± 24	1,0 ± 0,1	151 ± 71	3,3 ± 1,1	
<b>T3_F</b>	7 dias após	22 ± 0,1	5,8 ± 0,4	34 ± 5,0	2,1 ± 1,8	30 ± 4,4	7,0 ± 4,8	1,0 ± 0,2	155 ± 62	3,4 ± 0,9	T3-T4
<b>T3_M</b>	03/12/2018	22 ± 0,4	6,0 ± 0,2	42 ± 12	1,1 ± 1,0	25 ± 4,6	5,5 ± 0,9	1,2 ± 0,3	90 ± 12	4,5 ± 2,9	15,1
<b>T3_V</b>		21 ± 0,1	4,8 ± 0,0	443 ± 31	0,4 ± 0,2	142 ± 30	57 ± 38	8,6 ± 1,6	1049 ± 267	137 ± 233	
<b>T3_MV</b>		21 ± 0,3	4,8 ± 0,0	431 ± 25	0,3 ± 0,1	150 ± 20	49 ± 11	9,1 ± 1,6	1415 ± 27	157 ± 153	

<b>T4_C</b>		21 ± 0,5	6,3 ± 0,5	33 ± 5,1	2,6 ± 0,8	25 ± 16	8,0 ± 8,5	0,5 ± 0,4	151 ± 40	37 ± 35	
<b>T4_D</b>		21 ± 0,6	5,9 ± 0,3	37 ± 6,4	4,4 ± 3,6	28 ± 23	14 ± 11	1,2 ± 0,8	158 ± 84	7,9 ± 3,5	
<b>T4_F</b>	14 dias após	21 ± 0,1	5,7 ± 0,3	31 ± 3,7	3,7 ± 4,2	26 ± 1,5	7,6 ± 1,8	0,8 ± 0,3	120 ± 47	4,7 ± 3,9	T4-T5
<b>T4_M</b>	10/12/2018	21 ± 0,4	6,0 ± 0,3	46 ± 14	1,2 ± 0,7	26 ± 13	5,6 ± 3,2	0,5 ± 0,1	163 ± 53	4,9 ± 3,3	4,1
<b>T4_V</b>		20 ± 0,3	5,5 ± 0,2	440 ± 40	2,9 ± 4,6	123 ± 15	60 ± 11	7,8 ± 2,0	891 ± 251	3,8 ± 0,4	
<b>T4_MV</b>		20 ± 0,3	5,4 ± 0,3	427 ± 44	3,1 ± 4,8	102 ± 10	60 ± 28	7,1 ± 2,5	962 ± 254	3,3 ± 0,2	
<b>T5_C</b>		25 ± 0,2	6,3 ± 0,1	35 ± 4,9	1,0 ± 0,4	13 ± 2,6	24 ± 39	0,6 ± 0,1	102 ± 28	32 ± 3,1	
<b>T5_D</b>		25 ± 0,5	6,3 ± 0,1	36 ± 18	0,9 ± 0,4	14 ± 8,3	16 ± 11	1,5 ± 1,0	194 ± 74	52 ± 59,7	
<b>T5_F</b>	21 dias após	25 ± 0,4	6,3 ± 0,2	41 ± 11	1,5 ± 1,3	12 ± 3,7	16 ± 14	1,3 ± 0,3	109 ± 57	8,5 ± 3,7	T5-T6
<b>T5_M</b>	17/12/2018	24 ± 0,3	6,4 ± 0,2	60 ± 15	0,7 ± 0,4	20 ± 13	12 ± 3,7	1,1 ± 0,1	123 ± 26	16 ± 0,0	75,6
<b>T5_V</b>		23 ± 0,1	6,3 ± 0,1	533 ± 39	0,0 ± 0,0	71 ± 18	17 ± 6,9	14,2 ± 5,2	1226 ± 228	0,0 ± 0,0	
<b>T5_MV</b>		23 ± 0,3	6,4 ± 0,5	526 ± 61	0,1 ± 0,1	72 ± 81	30 ± 12	6,6 ± 3,5	1492 ± 305	0,0 ± 0,0	
<b>T6_C</b>		23 ± 0,3	6,4 ± 0,1	34 ± 6,1	2,0 ± 1,2	6,7 ± 4,0	15 ± 7,9	1,0 ± 0,7	323 ± 434	79 ± 26	
<b>T6_D</b>		23 ± 0,4	6,4 ± 0,1	46 ± 5,8	1,1 ± 0,6	6,9 ± 5,7	16 ± 7,0	1,2 ± 0,4	158 ± 14	61 ± 14	
<b>T6_F</b>	30 dias após	23 ± 0,2	6,2 ± 0,1	42 ± 17	2,4 ± 1,6	6,2 ± 2,0	27 ± 10	1,0 ± 1,0	136 ± 23	55 ± 10	T6-T7
<b>T6_M</b>	26/12/2018	23 ± 0,0	6,4 ± 0,1	59 ± 20	1,3 ± 0,8	7,6 ± 3,0	21 ± 19	1,4 ± 0,4	94 ± 36	49 ± 14	92,1
<b>T6_V</b>		22 ± 0,2	6,8 ± 0,1	541 ± 39	0,5 ± 0,2	35 ± 1,4	42 ± 32	13,7 ± 3,2	1021 ± 154	1649 ± 70	
<b>T6_MV</b>		22 ± 0,4	6,8 ± 0,1	522 ± 54	0,5 ± 0,4	44 ± 11	60 ± 32	12,9 ± 4,9	1506 ± 415	1707 ± 72	
<b>T7_C</b>		26 ± 0,4	6,6 ± 0,2	38 ± 9,3	2,8 ± 2,3	16 ± 11	23 ± 18	1,1 ± 0,2	109 ± 29	59 ± 14	
<b>T7_D</b>		26 ± 0,6	6,5 ± 0,0	44 ± 12	2,3 ± 3,2	12 ± 2,1	61 ± 23	1,9 ± 0,5	150 ± 45	47 ± 7,4	
<b>T7_F</b>	45 dias após	26 ± 0,2	6,9 ± 0,2	50 ± 20	5,4 ± 1,9	14 ± 4,3	51 ± 5,0	1,6 ± 0,1	123 ± 23	32 ± 6,0	T7-T8
<b>T7_M</b>	10/01/2019	26 ± 0,2	6,7 ± 0,1	66 ± 23	4,1 ± 0,8	15 ± 7,6	35 ± 4,6	1,0 ± 0,3	107 ± 22	23 ± 15	151,2
<b>T7_V</b>		24 ± 0,1	7,3 ± 0,1	552 ± 19	0,2 ± 0,2	51 ± 14	28 ± 9,6	31,4 ± 3,7	892 ± 132	2102 ± 309	
<b>T7_MV</b>		24 ± 0,2	7,1 ± 0,1	378 ± 324	0,1 ± 0,1	60 ± 5,1	50 ± 11	27,3 ± 1,3	1146 ± 94	2252 ± 110	
<b>T8_C</b>		21 ± 0,1	6,7 ± 0,1	43 ± 9,7	1,9 ± 1,1	18 ± 8,8	30 ± 44	1,3 ± 1,0	96 ± 76	83 ± 77	
<b>T8_D</b>		21 ± 0,3	6,6 ± 0,0	51 ± 12	1,3 ± 0,5	12 ± 2,3	31 ± 27	1,5 ± 0,8	131 ± 58	28 ± 16	
<b>T8_F</b>	75 dias após	21 ± 0,1	6,8 ± 0,2	35 ± 30	3,6 ± 1,1	31 ± 5,1	44 ± 3,0	2,5 ± 0,2	193 ± 10	24 ± 12	
<b>T8_M</b>	10/02/2019	22 ± 0,2	6,9 ± 0,1	77 ± 20	4,7 ± 0,6	26 ± 12	39 ± 17	0,9 ± 0,8	139 ± 18	42 ± 28	
<b>T8_V</b>		22 ± 0,4	6,9 ± 0,4	336 ± 157	0,2 ± 0,1	24 ± 19	23 ± 12	7,9 ± 5,9	328 ± 160	1792 ± 69	
<b>T8_MV</b>		21 ± 0,4	7,1 ± 0,1	399 ± 17	0,1 ± 0,1	39 ± 13	32 ± 8,9	8,0 ± 3,0	807 ± 1029	1816 ± 36	

#### 4.2.2. Quantificação dos agrotóxicos

A quantificação dos ingredientes ativos 2,4-D e fipronil foi realizada usando Cromatografia Líquida acoplada em Espectrometria de Massa (LC-MS/MS), com um cromatógrafo Agilent 1200 conectado a um espectrômetro de massa Triplo Quadrupolo com ionização por eletropulverização (ESI) (Agilent 6410) em modo negativo. Os valores de LOD (limite de detecção) e LOQ (limite de quantificação) variaram de 0,05 a 5,0 ng/mL e 0,1 a 10 ng/mL, respectivamente para os dois agrotóxicos. A descrição de todo método de extração e análise foi descrito em GOULART et al. (2020). As médias das concentrações obtidas constam na Tabela 4.

**Tabela 4.** Média da concentração  $\pm$  desvio padrão (DP) dos agrotóxicos ao longo do tempo ( $\mu\text{g/L}$ ) para C (controle), D (2,4-D), F (fipronil), M (mistura dos agrotóxicos), V (vinhaça) e MV (mistura dos agrotóxicos e vinhaça)

		<b>C</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>MV</b>
		Média $\pm$ DF	Média $\pm$ DF	Média $\pm$ DF	Média $\pm$ DF	Média $\pm$ DF	Média $\pm$ DF
<b>T1</b>	<b>2,4-D</b>	0,04 $\pm$ 0,04	1385 $\pm$ 268	< LOQ	1419 $\pm$ 73	< LOQ	656 $\pm$ 59
	<b>Fipronil</b>	< LOQ	< LOQ	43 $\pm$ 11	45 $\pm$ 2,4	0,7 $\pm$ 0,1	17 $\pm$ 0,3
<b>T2</b>	<b>2,4-D</b>	0,15 $\pm$ 0,03	741 $\pm$ 67	< LOQ	686 $\pm$ 22	0,001 $\pm$ 0,001	473 $\pm$ 29
	<b>Fipronil</b>	0,014 $\pm$ 0,003	< LOQ	9 $\pm$ 0,5	11 $\pm$ 2,8	20 $\pm$ 3	5 $\pm$ 1,5
<b>T3</b>	<b>2,4-D</b>	0,20 $\pm$ 0,08	523 $\pm$ 54	< LOQ	489 $\pm$ 20	< LOQ	319 $\pm$ 28
	<b>Fipronil</b>	0,004 $\pm$ 0,0009	< LOQ	8 $\pm$ 1,04	11 $\pm$ 0,1	< LOQ	7 $\pm$ 1,4
<b>T4</b>	<b>2,4-D</b>	0,13 $\pm$ 0,03	376 $\pm$ 30	< LOQ	402 $\pm$ 66	0,1 $\pm$ 0	209 $\pm$ 0
	<b>Fipronil</b>	0,005 $\pm$ 0,001	< LOQ	3,2 $\pm$ 1,1	6 $\pm$ 0,3	0,01 $\pm$ 0	6 $\pm$ 0
<b>T5</b>	<b>2,4-D</b>	0,062 $\pm$ 0,03	485 $\pm$ 102	< LOQ	540 $\pm$ 28	0,1 $\pm$ 0	234 $\pm$ 0
	<b>Fipronil</b>	0,010 $\pm$ 0,001	< LOQ	3,5 $\pm$ 1,2	5 $\pm$ 0,1	0,006 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0
<b>T6</b>	<b>2,4-D</b>	0,15 $\pm$ 0,08	304 $\pm$ 84	0,07 $\pm$ 0,06	425 $\pm$ 54	0,4 $\pm$ 0	9,5 $\pm$ 0
	<b>Fipronil</b>	0,002 $\pm$ 0,001	< LOQ	2,0 $\pm$ 1,2	3,5 $\pm$ 0,5	0,006 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0
<b>T7</b>	<b>2,4-D</b>	0,056 $\pm$ 0,003	148 $\pm$ 54	< LOQ	207 $\pm$ 40	0,2 $\pm$ 0	9,5 $\pm$ 0
	<b>Fipronil</b>	0,001 $\pm$ 0,0003	< LOQ	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	< LOQ	3 $\pm$ 0
<b>T8</b>	<b>2,4-D</b>	0,012 $\pm$ 0,003	122 $\pm$ 79	0,03 $\pm$ 0,01	240 $\pm$ 35	0,2 $\pm$ 0	0,7 $\pm$ 0
	<b>Fipronil</b>	0,001 $\pm$ 0,0005	< LOQ	0,1 $\pm$ 0,09	0,1 $\pm$ 0,07	0,004 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0

#### 4.2.3. Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar

A vinhaça utilizada nos experimentos foi obtida em uma usina de cana-de-açúcar e sua caracterização foi realizada de acordo com os métodos descritos em APHA (2018). O teor de metais foi obtido através de espectrofotometria de absorção atômica direta (AA 240FS VARIAN). A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) foi determinada pelo consumo de oxigênio em um tempo de incubação de 5 dias, e a demanda química de oxigênio (DQO) pelo método de refluxo fechado. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros físicos e químicos da vinhaça bruta

<b>Parâmetro</b>	<b>Unidade</b>	<b>Vinhaça Bruta</b>
pH	-	3,91
Condutividade elétrica	µS/cm	8420
Salinidade	%	4,5
Total de sólidos dissolvidos	mg/L	4450
Dureza	mg CaCO <sub>3</sub> /L	3500
Nitrogênio total	mg/L	639
Fósforo Total	µg/L	149670
Nitrato	µg/L	9289
Nitrito	µg/L	233
Amônio	µg/L	52640
Pi (fosfato inorgânico)	µg/L	82951
TDP (fósforo total dissolvido)	µg/L	84901
Silicato	mg/L	322
BOD	mg/L	46500
COD	mg/L	107000
Cromo	mg/L	0,207
Cobre	mg/L	3
Chumbo	mg/L	0,34
Manganês	mg/L	6,24
Ferro	mg/L	246,9
Níquel	mg/L	0,183
Cádmio	mg/L	0,025
Zinco	mg/L	1,225
Cobalto	mg/L	0,219
Lítio	mg/L	0,031
Magnésio	mg/L	391
Antimônio	mg/L	0,53
Alumínio	mg/L	499,9
Bário	mg/L	1,95
Cálcio	mg/L	1140
Sódio	mg/L	60
Potássio	mg/L	3360

## Referências

ANDERSEN, J. M. An Ignition Method for Determination of Total Phosphorus in Lake Sediments. **Water Research**, v. 10, n. 4, p. 329–331, 1 jan. 1976.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Edição: 22nd Revised ed. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater**. 23rd. ed. American Public Health Association, 2018.

FIGUEIRÊDO, L. P. de et al. Impact of Temperature on the Toxicity of Kraft 36 EC® (a.s. Abamectin) and Score 250 EC® (a.s. Difenconazole) to Soil Organisms under Realistic Environmental Exposure Scenarios. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 194, p. 1–7, maio 2020.

GOULART, B. V. et al. Matrix Effect Challenges to Quantify 2,4-D and Fipronil in Aquatic Systems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 12, p. 797, 27 nov. 2020.

HANSEN, H. P.; KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: **Methods of Seawater Analysis**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 1999. p. 159–228.

MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of Abamectin and Difenconazole Mixtures to a Neotropical Cladoceran after Simulated Run-off and Spray Drift Exposure. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 185, p. 58–66, abr. 2017.

PINTO, T. J. da S. et al. Functional Responses of *Hyalella Meinerti* after Exposure to Environmentally Realistic Concentrations of 2,4-D, Fipronil, and Vinasse (Individually and in Mixture). **Aquatic Toxicology**, v. 231, p. 105712, 1 fev. 2021.

## 5. CAPÍTULO I – Ensaio de toxicidade com *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta)

### 5.1. Introdução

As algas são organismos autotróficos fotossintetizantes, que possuem papel ecológico importante pela sua capacidade de produzir oxigênio para o meio. Além disso, são a base da cadeia alimentar aquática por serem o principal alimento de uma série de comunidades, como por exemplo, zooplâncton, pequenos peixes e macroinvertebrados (ANDERSEN, 2022). Por essas razões são conhecidos como os produtores primários, pois produzem matéria orgânica e oxigênio para o metabolismo dos demais níveis da cadeia alimentar, os consumidores (WOJCIECHOWSKI, 2013). Estes organismos são uni ou pluricelulares, com células únicas de 1 µm até espécies multicelulares que podem crescer até 60 metros (FRITSCH, 1944), assim sendo classificadas como micro e macroalgas.

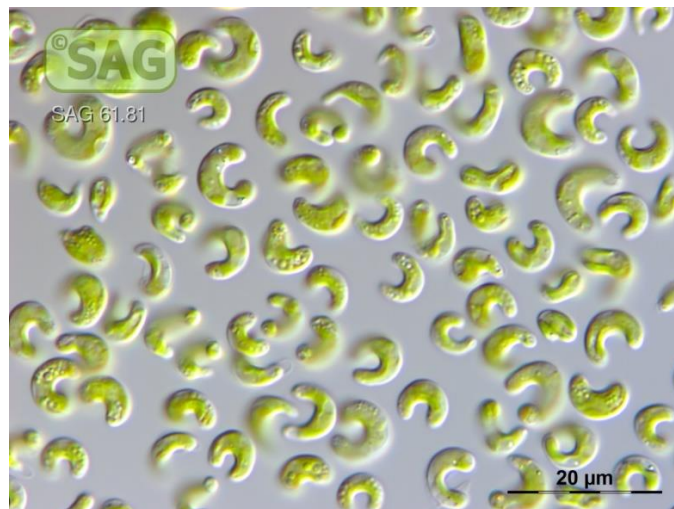
Além da importância ecológica, as algas também possuem valor econômico e são utilizadas em diversos mercados, como na indústria alimentícia para produção de alimento destinado à nutrição humana e animal; na agricultura, como bioestimulantes e biofertilizantes, na indústria farmacêutica e de cosméticos, como produtos de cuidado com a pele, protetores solares, antioxidantes e antibacterianos. Também podem ser usadas para a produção de biocombustíveis, como bioetanol, biodiesel e biogás (BRASIL; GARCIA, 2016).

Nas ciências ambientais, as algas são importantes bioindicadores de qualidade ambiental, pois vários fatores envolvendo o equilíbrio dos produtores primários podem ser uma resposta a poluição dos sistemas aquáticos. Por exemplo, a eutrofização, é definida pelo crescimento excessivo de plantas e algas devido ao aumento na disponibilidade de fatores limitantes para a fotossíntese, como luz solar, dióxido de carbono e nutrientes (CARPENTER, 1981). A eutrofização é um processo que ocorre naturalmente na natureza, mas pode ser acelerado por ação antrópica, como descarte de esgoto sem tratamento, efluentes industriais e resíduos da agricultura com alto teor de nitrogênio e fósforo (CARPENTER et al., 1998). As consequências para o sistema aquático são a diminuição da diversidade de algas com a proliferação de espécies de cianobactérias que podem contaminar a água com toxinas, diminuição da diversidade de invertebrados e peixes e hipóxia pela redução drástica dos níveis de oxigênio na água e alta turbidez. Para a saúde humana, pode ocorrer consequências graves através da contaminação da água de abastecimento por toxinas, levando a intoxicação e até morte (SANCHES et al., 2012).

Como consequência, através da importância das algas e do equilíbrio dessa comunidade para os ecossistemas aquáticos e a saúde humana, elas são instrumentos relevantes em avaliações ecotoxicológicas desde a década de 1960 (MORENO-GARRIDO; ARAÚJO, 2015). Dentre as espécies padronizadas e utilizadas mundialmente para avaliações de ecotoxicidade de água doce está a alga verde *Raphidocelis subcapitata* (OECD, 2011).

*Raphidocelis subcapitata* é uma microalga unicelular do filo Chlorophyta, considerado o grupo mais diversificado com mais de 7.500 espécies presentes em uma variedade de habitats. Esta espécie tem um formato curvo, com comprimento entre 8 e 14  $\mu\text{m}$  e largura entre 2 e 3  $\mu\text{m}$  (Figura 7), e como todas as algas verdes eucariontes são caracterizadas pela presença de cloroplasto com envelope de membrana dupla, clorofila *a* e *b*, tilacóides empilhados e amido interplastidial (ARORA; SAHOO, 2015).

**Figura 7.** Células da alga verde cosmopolita *Raphidocelis subcapitata*



**Fonte:** M. Lorenz (2016)

A alta sensibilidade de *R. subcapitata* a substâncias como agrotóxicos (MOREIRA et al., 2020), fármacos (GONZÁLEZ-PLEITER et al., 2013) e metais (ARUOJA et al., 2009) fazem com que os testes de avaliação do crescimento dessa espécie sejam os mais realizados em todo o mundo em programas de monitoramento da qualidade de corpos d'água doce (TOUSOVA et al., 2017). Por se tratar de uma microalga cosmopolita, ela está presente na norma brasileira para avaliações ecotoxicológicas com algas NBR 12648 de 2018 (ABNT, 2018) e também na norma NBR 13373 de 2017 (ABNT, 2017) como fonte de alimento para *C. silvestrii*, consumidor primário da cadeia alimentar de sistemas de água doce brasileiros.



Neste sentido, a partir da relevância ecológica e experimental de *R. subcapitata* e a problemática da possível contaminação dos ecossistemas aquáticos pelas atividades da indústria sucroalcooleira, o objetivo do presente capítulo foi avaliar a ecotoxicidade dos agrotóxicos DMA<sup>®</sup> (i.a. 2,4-D) e Regent<sup>®</sup> (i.a. fipronil) e da vinhaça da cana-de-açúcar, isolados e em mistura, sobre a alga cosmopolita *R. subcapitata* através de amostras de mesocosmos e experimentos laboratoriais. Com isso, espera-se colaborar para o aumento de informações referentes aos efeitos destes contaminantes no ambiente com o intuito de proteger o equilíbrio da base da cadeia trófica aquática.

## 5.2. Material e Métodos

### 5.2.1. Cultivo e teste de sensibilidade

As células iniciais de *Raphidocelis subcapitata* foram obtidas das culturas-estoque mantidas em laboratório (NEEA/CRHEA/USP) e replicadas em meio de cultivo L.C. Oligo (AFNOR, 1980) para serem utilizadas nos experimentos. Uma amostra do lote obtido foi utilizada para realizar o teste de sensibilidade. Este procedimento é recomendado para avaliar as condições fisiológicas das células e comparar os resultados obtidos com os lotes anteriores obtidos no mesmo laboratório.

Para tal, células de *R. subcapitata* na fase exponencial de crescimento foram expostas a substância de referência cloreto de sódio (NaCl) por 96 horas em cinco concentrações e um controle (0; 1,0; 2,0; 3,5; 5,0; 6,5 g/L) para determinar o valor de CI<sub>50</sub> (inibição do crescimento algal em 50 %). O teste foi realizado com as concentrações em triplicata utilizando erlenmeyers com 250 ml de capacidade contendo 100 ml de solução teste e algas inoculadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL. O experimento foi realizado com pH entre 7,0 e 7,3, temperatura de  $25 \pm 2$  °C, agitação contínua entre 100 e 175 rpm em mesa agitadora e luminosidade contínua entre 3.800 e 4.500 lux. Todos os procedimentos adotados para armazenamento, repique para novo lote e o teste de sensibilidade seguiram as diretrizes da norma brasileira para a espécie NBR 12648:2018 (ABNT, 2018).

Após o final do experimento, uma alíquota de cada erlenmeyer foi inserida em microtubo e fixada com formaldeído tamponado com bórax (concentração final de 1 %). As amostras foram deixadas no escuro em geladeira por 10 minutos e congeladas em nitrogênio líquido antes de serem armazenadas em freezer.

A quantificação final do crescimento algal foi determinada através de citômetro de fluxo Becton-Dickinson FACSCalibur<sup>®</sup> equipado com laser íon-argônio 15 mW (emissão a 488 nm).

As células foram identificadas em citogramas usando parâmetros de dispersão lateral (SSC-H) versus fluorescência vermelha (FL3-H), assim como em Sarmiento et al. (2008). Os dados foram obtidos através do software BD CellQuest Pro 6 e a análise do citograma com o software FlowJo v.10.0.8.

### 5.2.2. Testes em laboratório

Os testes de laboratório tiveram duas etapas, sendo a primeira para definir o valor de  $CI_{50-96}$  horas dos produtos comerciais. Nesta, para o herbicida DMA<sup>®</sup> foram realizados testes de toxicidade para avaliar o crescimento celular da alga utilizando um controle e cinco concentrações: 0; 50; 100; 200; 400 e 800 mg/L. Para o inseticida Regent<sup>®</sup>, foram testados um controle e nove concentrações: 0; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,2 e 3,78 mg/L. Esta faixa de concentrações foi testada pois no teste preliminar até 2,0 mg/L não houve diferenças com relação ao controle, através disso, testou-se a toxicidade até o limite de solubilidade em água a 20 °C (3,78 mg/L) definido pela IUPAC (2019), no caso de 2,4-D este limite varia com o pH da água entre 30 e 45 g/L.

A segunda etapa dos testes foi realizada com as mesmas concentrações dos agrotóxicos e da vinhaça testadas em mesocosmos, com diferença do meio teste que foi o mesmo utilizado no cultivo e no teste de sensibilidade. O teste foi realizado nas mesmas condições físicas e químicas do teste de sensibilidade, também em triplicata, e com uma concentração nominal do herbicida ( $D = 447 \mu\text{g/L}$ ), uma do inseticida ( $F = 63,5 \mu\text{g/L}$ ), a dose da vinhaça aplicada ( $V = 1,3 \%$  v/v) e a mistura dos agrotóxicos (M) e dos agrotóxicos com a vinhaça (MV), totalizando cinco tratamentos e um controle.

Ao final dos experimentos todas as amostras foram acondicionadas similarmente aos testes de sensibilidade, com a contagem das células realizadas através de citometria de fluxo. Ainda, além do  $CI_{50-96}$  horas, a taxa média de crescimento específico foi obtida de acordo com a equação 1 (USEPA, 2012):

$$\mu = [\ln(df) - \ln(di)]/t \quad (1)$$

onde:  $\mu$  = taxa de crescimento específico ( $\text{dia}^{-1}$ );  $df$  = biomassa observada (densidade celular) ao final do experimento;  $di$  = biomassa observada (densidade celular) no início do experimento;  $t$  = tempo de exposição (em dias).

Para as amostras com as concentrações testadas nos mesocosmos, o crescimento algal ao longo do teste foi acompanhado com retiradas de alíquotas de cada réplica a cada 24 horas. Foram verificados também os valores médios de FL3-H (clorofila *a*), SSC-H (complexidade

celular) e FSC-H (tamanho celular) da população das algas, todos estes expressos em unidades arbitrárias. Por último, as medidas de espécies reativas de oxigênio (ERO, em inglês, ROS) foram realizadas como descrito em Gebara et al. (2020) com a determinação feita através da análise de FL3-H (fluorescência vermelha) versus FL1-H (fluorescência verde).

### 5.2.3. Testes com amostras dos mesocosmos

Os testes de toxicidade com as amostras da água retiradas dos mesocosmos foram realizados com cinco amostragens diferentes: 3 horas após a contaminação (dia 0) (T1), 15 dias (T4), 30 dias (T6), 45 dias (T7) e 75 dias (T8). As amostras foram filtradas com malha de 20 µm para evitar que outros organismos permanecessem nas amostras. Após isso, os tratamentos foram distribuídos em três réplicas cada, em erlenmeyers previamente esterilizados e assim como indicado para amostras ambientais, todos foram enriquecidos com as soluções utilizadas nos testes padrões com o meio L.C. Oligo para favorecer o crescimento da alga (ABNT, 2018). *R. subcapitata* foi inoculada em condições assépticas e os testes foram executados como descrito em 5.2.1 e 5.2.2, sem a retirada de alíquotas a cada 24 horas, sendo verificado somente o crescimento final da espécie nas amostras e a taxa média de crescimento específico. Na análise após a citometria de fluxo, assim como na etapa 2 anterior, foram obtidos os valores médios de FL3-H, SSC-H e FSC-H da população das algas.

### 5.2.4. Análise estatística

Os valores de  $CI_{50-96}$  horas do teste de sensibilidade e dos agrotóxicos foram obtidos através dos valores de densidade algal, a partir de regressão não linear, usando a curva logística de três parâmetros.

As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos para as taxas de crescimento específico, densidade celular, tamanho celular, complexidade e clorofila foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Dunnett e Tukey HSD quando os dados atendiam os requisitos de normalidade e homoscedasticidade, verificados através de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para os dados que não atendiam aos critérios, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Dunn.

Todas as análises citadas foram realizadas através do software Statistica versão 7.0 (STATSOFT, 2004).

### 5.3. Resultados e Discussão

#### 5.3.1. Teste de Sensibilidade

O valor de  $CI_{50-96}$  horas para a substância de referência cloreto de sódio foi de 4,7 g/L (aproximadamente 8 mS/cm) com limite inferior, superior e coeficiente de variação de 3,8 g/L, 5,5 g/L e 15 %, respectivamente. Este valor está um pouco acima das médias obtidas dos lotes anteriores avaliados por Vieira (2010) e Vanderlei (2015) no mesmo laboratório. Na primeira referência, a média de  $CI_{50-96}$  horas da alga até então denominada *Pseudokirchneriella subcapitata* foi de 3,11 g/L com limite inferior de 1,74 g/L e superior de 4,49 g/L. Neste caso, o valor obtido no experimento do presente trabalho é maior que o limite superior, no entanto o limite inferior está dentro do conjunto de dados. A segunda referência apresenta média de 3,49 g/L com limites inferior e superior de 1,11 e 5,86 g/L, respectivamente. Os valores obtidos, neste caso, se enquadram neste conjunto de dados, que é justamente os lotes que antecedem o repique para o lote utilizado para elaboração de todos os testes de toxicidade realizados no presente trabalho.

As referências na literatura para a sensibilidade de *R. subcapitata* ao NaCl possuem diferentes escalas de valores, por isso é importante manter a carta controle laboratorial, para colaborar na discussão de valores de toxicidade divergentes de uma mesma substância. Sobre os estudos realizados pode-se citar o trabalho de Santos et al. (2007), que apresenta  $CI_{50-72}$  horas de 0,87 g/L (0,085 mS/cm), cerca de 5,5 vezes mais sensível do que o valor obtido. Simmons (2012) apresenta o  $CI_{50-96}$  horas = 2,7 mS/cm, sendo que Silva (2017, dados não publicados) obteve valor de 1,3 e 1,6 g/L. Ribeiro (2017) obteve valores de inibição de crescimento mais próximo ao do presente estudo, com  $CI_{50-96}$  horas ~ 2,5 g/L (aproximadamente 4 mS/cm). Neste estudo em específico foi utilizado o mesmo meio teste que se usou para a avaliação da sensibilidade do presente trabalho, fator que pode ter sido determinante para a similaridade dos resultados de diferentes laboratórios e lotes. De qualquer forma, é importante salientar que diferenças interlaboratoriais às respostas em testes padrão de uma única espécie podem ter um fator de diferença de 3 ou mais (SPRAGUE, 1985; BAIRD et al. 1989).

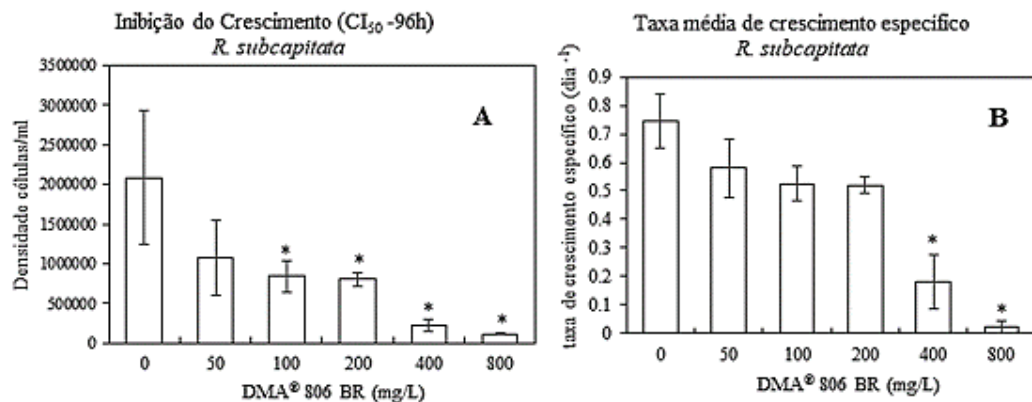
#### 5.3.2. Testes de toxicidade em laboratório

Nos testes de toxicidade com o agrotóxico DMA<sup>®</sup> 806 BR (i.a. 2,4-D) obteve-se em valor de  $CI_{50-96}$  horas para *Raphidocelis subcapitata* de 65 mg/L, com intervalo de confiança

(IC) 95 % entre 4 – 125 mg i.a./L ( $p = 0,04$ ;  $r = 0,87$ ). Devido as grandes diferenças nos limites inferiores e superiores não foi possível calcular valores de  $CI_{10}$  (inibição do crescimento algal em 10 %) ou  $CI_{20}$  (inibição do crescimento algal em 20 %) (ANOVA:  $F = 40,06$ ;  $p < 0,05$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ). Para o parâmetro densidade celular, verificou-se diferenças de todos os tratamentos contaminados em relação ao controle, com exceção da primeira concentração (50 mg/L) (Figura 7A).

Para a taxa média de crescimento específico, pela análise estatística (ANOVA:  $F = 42,1$ ;  $p < 0,05$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ) foram verificadas diferenças estatísticas somente nas duas últimas concentrações, demonstrando que, apesar da diferença na densidade celular das amostras, as células vivas nas concentrações anteriores mantiveram a taxa média de crescimento durante o experimento (Figura 7B). Os valores de CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado) para a inibição de crescimento calculada a partir da densidade celular foram 50 mg/L e 100 mg/L, respectivamente. Para a taxa média de crescimento específico os valores de CENO e CEO foram 200 mg/L e 400 mg/L.

**Figura 8.** Testes laboratoriais com o herbicida DMA® 806 BR com *R. subcapitata* (A: densidade celular e B: taxa média de crescimento específico). Asteriscos (\*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ ).



Na literatura, os valores de  $CE_{50}$  (concentração efetiva de efeito em 50 %) para diferenças na densidade populacional variam entre 20,7 e 41,7 mg/L de ingrediente ativo (ST-LAURENT et al., 1992; US EPA, 1992; FAIRCHILD et al., 1997). Fairchild et al. (1997) apresentaram valores de CENO e CEO de 25 e 50 mg/L, enquanto Garten & Frank (1984) obtiveram um valor de CENO de 100 mg/L.

Os resultados obtidos nesta pesquisa e os dados de literatura demonstram que a espécie *R. subcapitata* é sensível à presença de 2,4-D em altas doses. Em termos de CE e  $CI_{50}$  a espécie fotossintetizante mais sensível encontrada foi a macrófita de água doce *Myriophyllum spicatum*,

com  $CE_{50}$ -14 dias e  $CI_{50}$ -14 dias de crescimento de 5 e 13  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente (MOHR et al., 2013). Esta espécie é encontrada em vários lugares do mundo e é considerada uma planta invasora nas Américas (ISSG, 2022). Para espécies de algas, as diatomáceas de água doce parecem ser o grupo mais sensível (Tabela 6) ao 2,4-D, com o menor  $CE_{50}$ -48 horas de abundância da população de 55  $\mu\text{g/L}$  para a espécie *Gomphonema* sp. (WOOD et al., 2016). O organismo fotossintetizante menos sensível ao herbicida descrito na literatura é a cianobactéria de água doce *Synechocystis* sp. (Domínio Bacteria), com  $CE_{50}$ -9 dias de 747  $\text{mg/L}$  (ASLIM; OZTURK, 2009).

Para o inseticida Regente<sup>®</sup> 800 WG (i.a fipronil) não foi possível calcular o valor de  $CI_{50}$ ,  $CI_{20}$  e  $CI_{10}$  devido à ausência de toxicidade na espécie teste. Diferenças estatísticas foram verificadas para a densidade celular e taxa média de crescimento específico. Tanto para a densidade (ANOVA:  $F = 3,8$ ;  $p = 0,006$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ) quanto para a taxa média de crescimento específico (ANOVA:  $F = 4,3$ ;  $p = 0,003$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ) apenas duas concentrações tiveram diferenças significativas com relação ao controle (Figura 8). Sendo assim, o valor definido para  $CI_{50}$ -96 horas  $> 3,78$   $\text{mg/L}$ . Não foi possível definir CENO e CEO já que as concentrações com diferenças significativas ao controle foram concentrações intermediárias.

**Figura 9.** Testes laboratoriais com o inseticida Regente<sup>®</sup> 800 WG com *R. subcapitata* (A: densidade celular e B: taxa média de crescimento específico). Asteriscos (\*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ ).

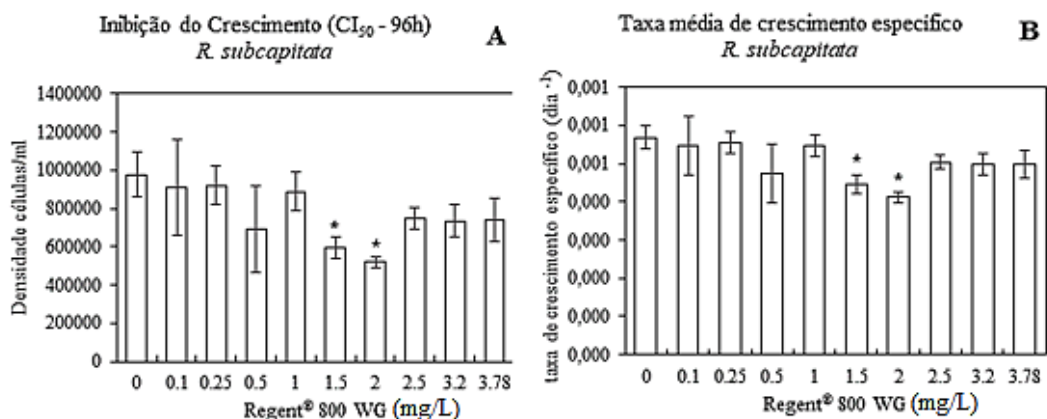


Tabela 6. Valores de CE<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub> de 2,4-D disponíveis na literatura para espécies de algas

Nome da espécie	Grupo	Ambiente	CE <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> (mg/L)	Duração do teste	Meio-teste	Referência *
<i>Gomphonema sp.</i>	Diatomácea	Água doce	0,055	48 horas	Água natural	Wood et al. (2016)
<i>Encyonema gracile</i>	Diatomácea	Água doce	0,11	48 horas	Água natural	Wood et al. (2016)
<i>Achnantheidium minutissimum</i>	Diatomácea	Água doce	0,32	48 horas	Água natural	Wood et al. (2016)
<i>Navicula cryptotenella</i>	Diatomácea	Água doce	0,50	48 horas	Água natural	Wood et al. (2016)
<i>Ulnaria ulna</i>	Diatomácea	Água doce	0,50	48 horas	Água natural	Wood et al. (2016)
<i>Cymbella sp.</i>	Diatomácea	Água doce	0,50	48 horas	Água natural	Wood et al. (2016)
<i>Gomphonema gracile</i>	Diatomácea	Água doce	0,50	48 horas	Água natural	Wood et al. (2016)
<i>Skeletonema costatum</i>	Diatomácea	Marinho	2,02	120 horas	Não disponível	US EPA (1992)
<i>Navicula pelliculosa</i>	Diatomácea	Água doce	2,02	120 horas	Não disponível	US EPA (1992)
<i>Anabaena flosaquae</i>	Cianobactéria	Água doce	2,02	120 horas	Não disponível	US EPA (1992)
<i>Lyngbya sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	2,21	24 horas	Meio Basal de Bold	Hawxby et al. (1977)
<i>Anabaena variabilis</i>	Cianobactéria	Água doce	2,21	48 horas	Meio Basal de Bold	Hawxby et al. (1977)
<i>Chlorococcum sp.</i>	Alga verde	Água doce	2,21	24 horas	Meio Basal de Bold	Hawxby et al. (1977)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Alga verde	Água doce	2,21	24 horas	Meio Basal de Bold	Hawxby et al. (1977)
<i>Anabaena sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	3,74	24 horas	Meio Allen e Arnon	Rodea-Palomares et al. (2012)
<i>Chaetoceros calcitrans forma pumilus</i>	Alga verde	Marinho	9,20	504 horas	Não disponível	His & Seaman (1993)
<b><i>Raphidocelis subcapitata</i></b>	Alga verde	Água doce	20,7	120 horas	Não disponível	US EPA (1992)
<i>Scenedesmus acutus</i>	Alga verde	Água doce	22,1	24 horas	Não disponível	Grossmann et al. (1992)
<b><i>Raphidocelis subcapitata</i></b>	Alga verde	Água doce	24,2	96 horas	Meio AAP	St. Laurent et al. (1992)
<i>Anabaena sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	25,2	24 horas	Meio Allen e Arnon	Rodea-Palomares et al. (2015)
<b><i>Raphidocelis subcapitata</i></b>	Alga verde	Água doce	25,9	96 horas	Meio AAP	St. Laurent et al. (1992)
<b><i>Raphidocelis subcapitata</i></b>	Alga verde	Água doce	41,8	96 horas	Meio ASTM para algas	Fairchild et al. (1997)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Alga verde	Água doce	45,5	96 horas	Meio ASTM para algas	DeLorenzo & Serrano (2006)
<i>Chlorococcum sp.</i>	Alga verde	Marinho	50,0	240 horas	Não disponível	Walsh (1972)
<i>Isochrysis galbana</i>	Alga marrom	Marinho	50,0	240 horas	Não disponível	Walsh (1972)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomácea	Marinho	50,0	240 horas	Não disponível	Walsh (1972)

<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Alga verde	Marinho	75,0	240 horas	Não disponível	Walsh (1972)
<i>Chlorococcum sp.</i>	Alga verde	Marinho	60,0	1,5 horas	Não disponível	Walsh (1972)
<i>Isochrysis galbana</i>	Alga marrom	Marinho	60,0	1,5 horas	Não disponível	Walsh (1972)
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Diatomácea	Marinho	60,0	1,5 horas	Não disponível	Walsh (1972)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Alga verde	Marinho	50,0	1,5 horas	Não disponível	Walsh (1972)
<i>Chlorella fusca</i>	Alga verde	Água doce	88,9	24 horas	Não disponível	Faust et al. (1993)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Alga verde	Água doce	98,0	480 horas	Meio Báslerová e Dvoracová	Fargasova (1994)
<i>Microcystis sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	122	216 horas	Meio BG-11	Aslim & Ozturk (2009)
<i>Chroococcus sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	134	216 horas	Meio BG-11	Aslim & Ozturk (2009)
<i>Microcystis sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	145	216 horas	Meio BG-11	Aslim & Ozturk (2009)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Alga verde	Marinho	160	1 hora	Meio SWYP	McFeters et al. (1983)
<i>Synechocystis sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	169	216 horas	Meio BG-11	Aslim & Ozturk (2009)
<i>Synechococcus sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	188	216 horas	Meio BG-11	Aslim & Ozturk (2009)
<i>Chlorella fusca var. vacuolata</i>	Alga verde	Água doce	189	24 horas	Não disponível	Junghans (2006)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Alga verde	Marinho	247	24 horas	Meio SWYP	McFeters et al. (1983)
<i>Chroococcus sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	319	216 horas	Meio BG-11	Aslim & Ozturk (2009)
<i>Chroococcus sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	366	216 horas	Meio BG-11	Aslim & Ozturk (2009)
<i>Synechococcus sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	375	216 horas	Meio BG-11	Aslim & Ozturk (2009)
<i>Microcystis sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	643	216 horas	Meio BG-11	Aslim & Ozturk (2009)
<i>Synechocystis sp.</i>	Cianobactéria	Água doce	747	216 horas	Meio BG-11	Aslim & Ozturk (2009)

\* Referências e informações detalhadas sobre os estudos estão disponíveis na base de dados da US EPA (United States Environmental Protection Agency), disponível em <https://cfpub.epa.gov/ecotox/> na aba “Search”

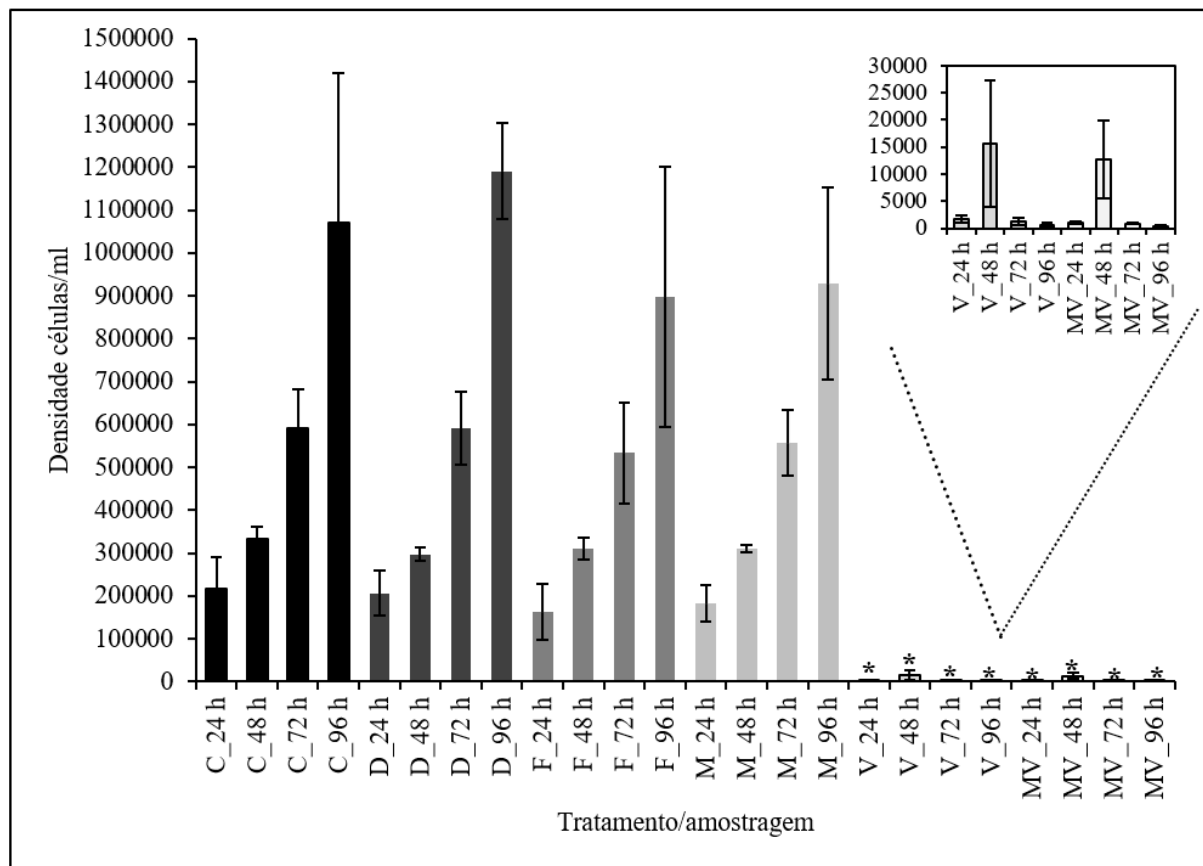


Por não possuir um mecanismo de ação voltado para algas e plantas, existem poucos estudos que avaliam o efeito de fipronil em espécies destes grupos. Para *R. subcapitata* apenas a avaliação de US EPA (1992) apresenta um valor de  $CE_{50-5 \text{ dias}} = 140 \mu\text{g/L}$  com relação a abundância. Em termos de efeito, Moreira et al. (2020) observaram efeitos na densidade celular e na taxa de crescimento específico a partir de  $125 \mu\text{g/L}$ . Em mistura com 2,4-D (entre 30 a  $500 \mu\text{g/L}$ ), os efeitos foram observados na taxa de crescimento específico apenas na concentração de  $500 \mu\text{g/L}$ , demonstrando antagonismo na mistura nestes dois parâmetros.

Outra alga verde de água doce com valor de  $CE_{50}$  para fipronil é a espécie *Scenedesmus acutus var. acutus*, com  $CE_{50-3 \text{ dias}} = 540 \mu\text{g/L}$ , relacionado também à abundância e o valor de CEO de  $200 \mu\text{g/L}$  para efeito na fotossíntese (QU et al., 2014). Neste mesmo estudo (QU et al., 2014), estão disponíveis também os valores de  $CE_{50-3 \text{ dias}}$  para os enantiômeros de fipronil: R-fipronil (dextrogiro) e S-fipronil (levogiro) de 290 e  $1500 \mu\text{g/L}$ , respectivamente. Além das duas algas citadas, a espécie marinha *Dunaliella tertiolecta* também teve a população avaliada com os valores de CENO e CEO de 250 e  $500 \mu\text{g/L}$  e com  $CE_{50-4 \text{ dias}} = 631,2 \mu\text{g/L}$  (OVERMYER et al., 2007). Estes resultados mostram que apesar de fipronil não ser um ingrediente ativo direcionado para algas, ele pode apresentar efeitos até maiores que 2,4-D, dependendo da espécie-teste.

Com relação à segunda etapa dos testes laboratoriais, os resultados do crescimento algal das concentrações aplicadas em mesocosmos replicadas em laboratório com o meio LC Oligo em 24 (ANOVA:  $F = 209$ ;  $p < 0,001$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ), 48 (ANOVA:  $F = 12,8$ ;  $p < 0,001$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ), 72 (ANOVA:  $F = 35,9$ ;  $p < 0,001$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ) e 96 horas (ANOVA:  $F = 15,3$ ;  $p < 0,001$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ), mostraram que não houve diferenças significativas com o controle para tratamentos com os agrotóxicos isolados e em mistura. Apenas os dois tratamentos que continham vinhaça foram significativamente diferentes, com diminuição brusca da densidade celular. Nestes casos, as algas replicaram-se apenas entre 24 e 48 horas, após isso, a concentração voltou para valores próximos dos obtidos em 24 horas, demonstrando que ocorreu morte celular entre 48 e 72 horas. Ao final do teste, em ambos os tratamentos, vinhaça isolada e sua mistura com os agrotóxicos, a concentração celular estava 1500 e 2800 vezes menor que a média obtida no controle, respectivamente (Figura 9).

**Figura 10.** Médias do crescimento de *R. subcapitata* expostas as concentrações do experimento em mesocosmos para os tratamentos C, D, F, M, V e MV em meio oligo. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatísticas com o controle ( $p < 0.05$ ).



A partir dos resultados obtidos na avaliação dos valores de  $CI_{50}$  do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil obtidos no presente trabalho e os valores obtidos por outros autores na literatura, esperava-se que não ocorressem efeitos no crescimento de *R. subcapitata* com as concentrações avaliadas em mesocosmos. Sendo assim, os resultados obtidos em D, F e M já eram esperados. No caso dos tratamentos que continham vinhaça (V e MV), devido à composição da vinhaça (Tabela 5) e os estudos encontrados na literatura, efeitos na densidade das algas já eram esperados.

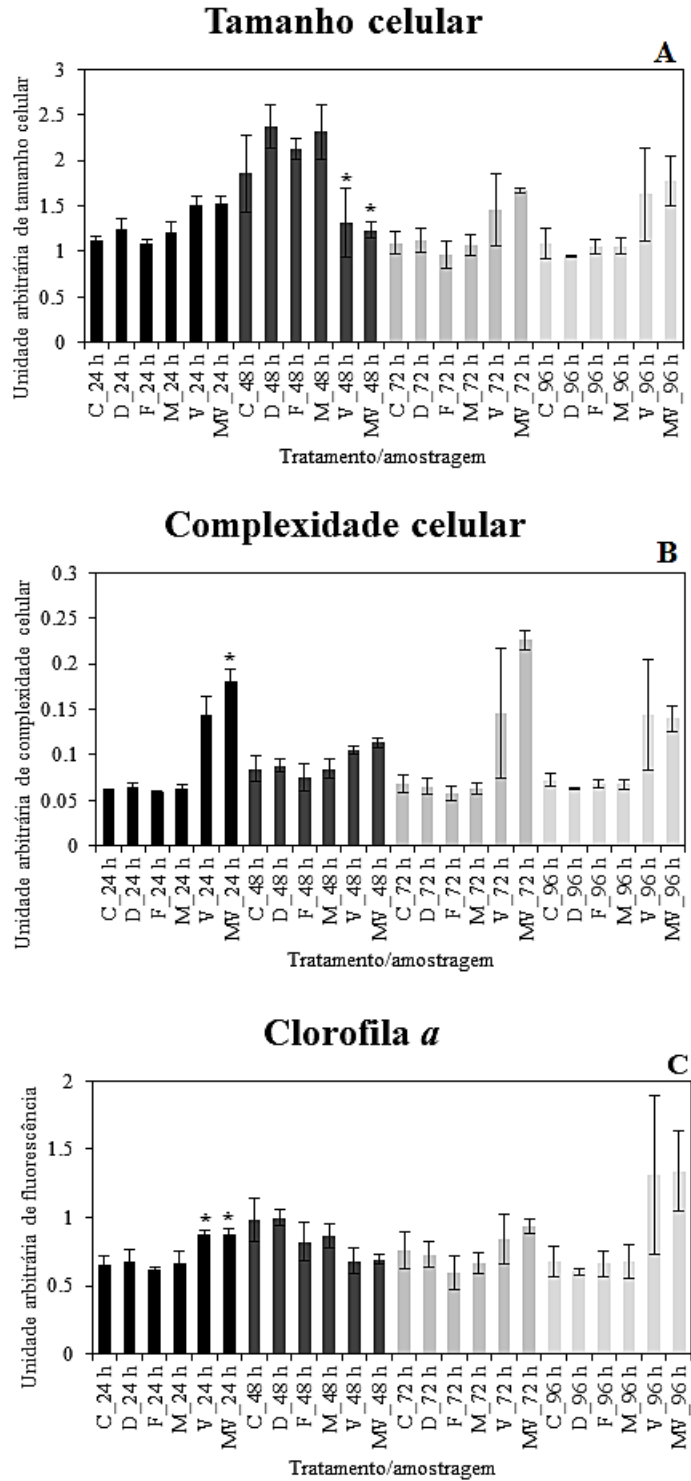
Na literatura, a grande parte de estudos que avaliam o efeito da vinhaça em algas objetiva avaliar a influência na biomassa algal para a produção de biocombustível (SANTANA et al., 2017; GUARIEIRO, 2019) ou como nutriente, devido à alta concentração de matéria orgânica, visando tratar e reduzir o volume de resíduo da vinhaça gerada (GOLLO, 2015; DOS SANTOS et al., 2016). No entanto, o uso para redução do resíduo deve acompanhar um estudo anterior da porcentagem benéfica ou tóxica para as algas. Como exemplos, para as espécies *Chlorella* sp. e *Tetraselmis suecica*, a avaliação realizada por Ozturk & Demir (2001) mostrou que concentrações entre 1 e 3 % de vinhaça foram benéficas para o crescimento e a atividade

fotossintética, no entanto, entre 5 e 10 % houve a diminuição do crescimento celular. Kadioğlu & Algur (1992) obtiveram um resultado similar com *Chlamydomonas reinhardtii*, com incremento no conteúdo de pigmentos e número de células entre 1 e 5 % e redução no crescimento acima de 10 % de vinhaça.

Em contrapartida, Ferreira et al. (2011), avaliaram o efeito ecotoxicológico da vinhaça da cana-de-açúcar em *R. subcapitata* após passar por tratamento utilizando um fungo. O  $CI_{50}$  da vinhaça antes do tratamento foi de 1,6 %, valor próximo do utilizado no presente trabalho. Após o tratamento, a porcentagem subiu para 15 %. O mesmo ocorreu com a espécie *Chlorella vulgaris*, onde uma porcentagem maior que 4 % de vinhaça bruta teve efeito agudo para espécie e este efeito foi reduzido após tratamento com digestão anaeróbia (MARQUES et al., 2013). Os resultados destes estudos demonstram que o pré-tratamento da vinhaça antes da aplicação em campo ou descarte seria uma alternativa para diminuir a toxicidade do resíduo.

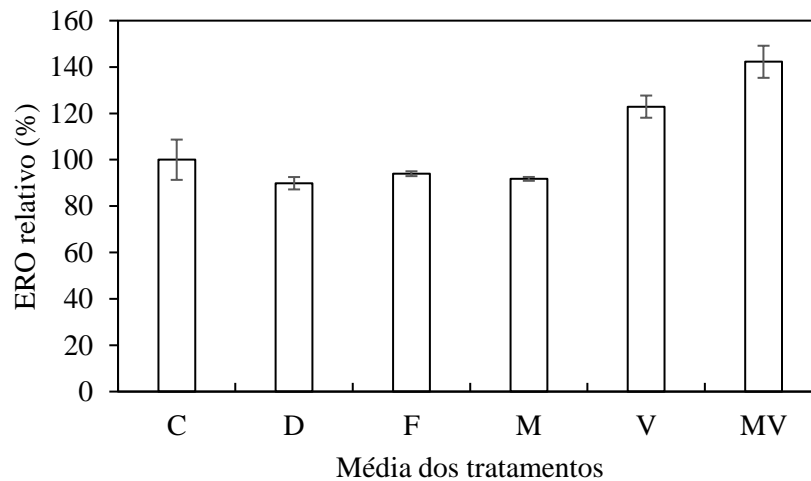
Com relação aos parâmetros tamanho celular, complexidade celular e fluorescência avaliados no presente estudo, as análises estatísticas realizadas mostraram que os tratamentos com os agrotóxicos isolados e em mistura não tiveram nenhuma diferença estatística com relação ao controle em nenhum dos três parâmetros ( $p < 0.05$ ; Figura 10). Nos tratamentos V e MV, houve diferenças na complexidade celular em MV nas amostras de 24 horas (ANOVA:  $F = 2,37$ ;  $p < 0,001$ ; Método de Dunnett's  $p = 0,016$ ) e Clorofila *a* para ambos (ANOVA:  $F = 2,92$ ;  $p = 0,004$ ; Método de Dunnett's  $p = 0,018$  e  $0,024$ ). Nesses mesmos tratamentos, ocorreram diferenças no tamanho celular em 48 horas (ANOVA:  $F = 1,61$ ;  $p = 0,002$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,001$ ).

**Figura 11.** Média do tamanho celular (A), complexidade celular (B) e Clorofila a (C) de *R. subcapitata* expostas as concentrações do experimento em mesocosmos para os tratamentos C, D, F, M, V e MV em meio oligo. Asteriscos (\*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ ).



A análise estatística das espécies reativas de oxigênio (Kruskal-Wallis  $H_5 = 10,31$   $p < 0,06$ ; Método de Dunn,  $p > 0.05$ ) não mostrou diferenças no ERO relativo (%) das amostras finais do experimento. A representação gráfica pode ser visualizada na Figura 11.

**Figura 12.** Espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas por *R. subcapitata* expostas aos tratamentos por 96 horas.



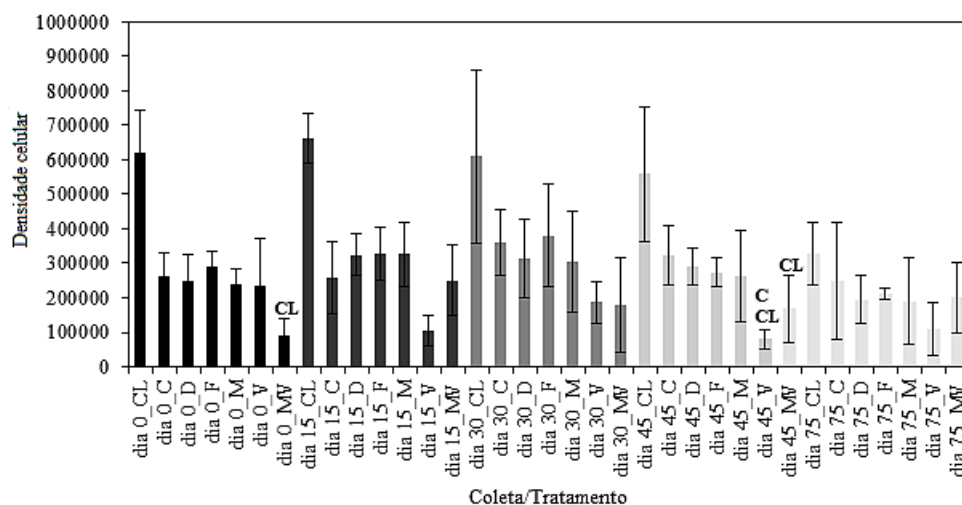
Moreira et al. (2020) avaliaram também os parâmetros de tamanho celular, complexidade e fluorescência (clorofila *a*) no intervalo de concentrações do presente trabalho para 2,4-D, fipronil e a mistura de ambos. Para 2,4-D o tamanho celular foi diferente do controle em todas as concentrações testadas (faixa entre 30 e 500  $\mu\text{g/L}$ ). Para complexidade não foram observados efeitos. A fluorescência foi significativamente maior que o controle nas últimas concentrações (350 e 500  $\mu\text{g/L}$ ). Para fipronil, o tamanho celular aumentou a partir de 125  $\mu\text{g/L}$  até a última concentração de 500  $\mu\text{g/L}$ . Assim, como 2,4-D não ocorreram efeitos na complexidade. Para fluorescência, assim como 2,4-D, os efeitos ocorreram nas duas últimas concentrações (250 e 500  $\mu\text{g/L}$ ). As misturas tiveram efeitos nestes três parâmetros também, além de alterarem a atividade fotossintética e as classes lipídicas. No presente estudo, os resultados não foram tão pronunciados como realizado por Moreira et al (2020). Para fipronil e a mistura, a hipótese é porque a dose testada de fipronil (63,5  $\mu\text{g/L}$ ) foi menor que a concentração de efeito em Moreira et al. (2020). Além disso, a metodologia também pode ter influenciado, já que em Moreira et al. (2020) foram utilizados fotoperíodo 12h:12h e agitação intermitente enquanto no presente trabalho a luz e a agitação foram constantes. Para 2,4-D, como foi utilizado a mesma espécie e a mesma formulação em ambos os trabalhos, é teorizado que a metodologia pode ter sido o principal fator. Os fatores citados acima, podem ter interferido na taxa de degradação e a ação dos agrotóxicos. Como a quantificação deles foi

realizada apenas na solução mãe utilizada para o preparo das concentrações, não é possível afirmar este efeito, sendo assim, apenas assume-se a possibilidade de a metodologia ter sido a responsável pelos diferentes resultados entre os estudos.

### 5.3.3. Testes de toxicidade com amostras dos mesocosmos

Os testes realizados com as amostras dos mesocosmos não mostraram muitas diferenças estatísticas entre os tratamentos contaminados e o controle, nem mesmo nos tratamentos contendo vinhaça (V e MV). Apesar disso, graficamente é possível verificar que estes dois tratamentos são os que apresentam, os menores níveis de densidade celular (Figura 13). Estatisticamente, provavelmente por causa da grande variabilidade amostral, poucas diferenças estatísticas entre os tratamentos foram confirmadas. Entre os cinco testes realizados, apenas no dia da contaminação e após 45 dias foi possível constatar diferenças na densidade celular. A análise estatística do teste do dia 0 (Kruskal-Wallis  $H_6 = 20,68$   $p = 0,0021$ ; Método de Dunn,  $p < 0,001$ ) mostrou diferenças de MV com o controle padrão do laboratório preparado com meio LC Oligo (CL). Com 45 dias, a análise (Kruskal-Wallis  $H_6 = 25,36$   $p = 0,0003$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ) mostrou diferenças de V com o controle do mesocosmos (C) e V e MV com CL.

**Figura 13.** Médias do crescimento de *R. subcapitata* exposta as amostras coletadas dos tratamentos C, D, F, M, V e MV em mesocosmos. As letras “CL” indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle do laboratório (CL) e a letra “C” diferenças com o controle (C) dos mesocosmos ( $p < 0,05$ ).



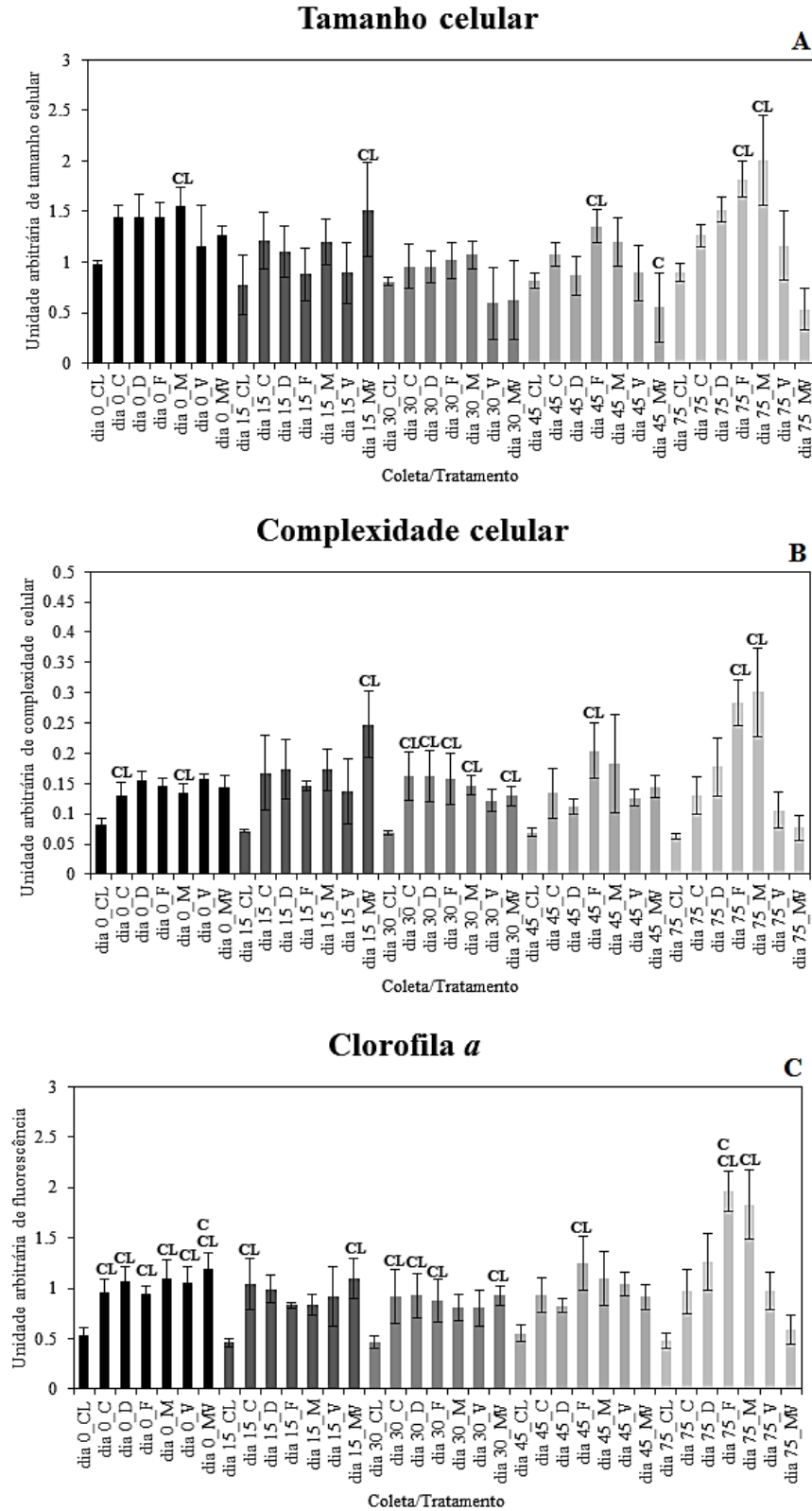
Para os parâmetros tamanho celular, complexidade celular e fluorescência, assim como na densidade celular, verifica-se que não houve grandes diferenças entre C e os tratamentos

contaminados. No entanto, comparando-os com CL os resultados foram diferentes, demonstrando a diferença entre meio laboratorial e amostras ambientais. Para o tamanho celular, as análises estatísticas mostraram diferenças estatísticas de M com CL no dia 0 (Kruskal-Wallis  $H_6 = 15,92$   $p = 0,014$ ; Método de Dunn,  $p = 0,043$ ), de MV com CL no dia 15 (ANOVA:  $F = 3,80$ ;  $p = 0,0048$ ; Método de Dunnett's  $p = 0,02$ ), de F com CL e MV com C no dia 45 (ANOVA:  $F = 8,92$ ;  $p < 0,0001$ ; Método de Dunnett's  $p = 0,02$ ) e por último, diferenças entre F e M com CL no dia 75. Em todas as diferenças citadas, os tratamentos apresentaram uma média do tamanho celular maior que CL. A representação gráfica das médias dos tratamentos ao longo do tempo está na Figura 13A.

No caso da complexidade celular, todas as diferenças estatísticas foram dos tratamentos do mesocosmos com o CL, ou seja, não teve nenhuma diferença entre os tratamentos contaminados e o controle. No dia 0, D e V foram diferentes de CL (Kruskal-Wallis  $H_6 = 19,23$   $p = 0,004$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ). No dia 15, somente MV (Kruskal-Wallis  $H_6 = 18,32$   $p = 0,005$ ; Método de Dunn,  $p < 0,0014$ ). No dia 30, todos os tratamentos foram diferentes de CL, exceto V (ANOVA:  $F = 2,31$ ;  $p = 0,054$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ). No dia 45, apenas F foi diferente de CL (Kruskal-Wallis  $H_6 = 21,52$   $p = 0,0015$ ; Método de Dunn,  $p < 0,002$ ), e por último, F e M foram diferentes dele no dia 75 (Kruskal-Wallis  $H_6 = 36,12$   $p < 0,0001$ ; Método de Dunn,  $p = 0,003$ ). Em todas as diferenças citadas, os tratamentos apresentaram uma média da complexidade celular maior que CL. A representação gráfica das médias dos tratamentos ao longo do tempo está na Figura 13B.

Para a fluorescência (clorofila *a*), diferenças entre o controle e os tratamentos contaminados ocorreram no dia 0, no caso de MV (ANOVA:  $F = 8,15$ ;  $p < 0,0001$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ) e F no dia 75 (Kruskal-Wallis  $H_6 = 35,47$   $p < 0,0001$ ; Método de Dunn,  $p < 0,03$ ). Todas as outras diferenças foram em relação a CL. No dia 0, todos os tratamentos foram diferentes de CL ( $p < 0,0001$ ), no dia 15, C e MV (Kruskal-Wallis  $H_6 = 17,39$   $p < 0,008$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ), no dia 30, todos os tratamentos com exceção de M e V (ANOVA:  $F = 2,53$ ;  $p = 0,038$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ), no dia 45 apenas F (Kruskal-Wallis  $H_6 = 18,95$   $p = 0,0042$ ; Método de Dunn,  $p = 0,007$ ) e por último F e M no dia 75 ( $p < 0,005$ ). Em todas as diferenças citadas, os tratamentos apresentaram uma média de clorofila maior que CL. A representação gráfica das médias dos tratamentos ao longo do tempo está na Figura 13C.

**Figura 14.** Média do tamanho celular (A), complexidade celular (B) e Clorofila *a* (C) de *R. subcapitata* exposta as amostras coletadas dos tratamentos C, D, F, M, V e MV em mesocosmos. As letras “CL” indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle do laboratório (CL) e a letra “C” diferenças com o controle dos mesocosmos ( $p < 0,05$ ).





Os resultados obtidos nos testes com as amostras dos mesocosmos, para os tratamentos V e MV, demonstram como os testes em laboratório podem diferir das avaliações de modelos ecossistêmicos e estudos de campo. Os mesocosmos por se tratar de um sistema complexo com várias comunidades inseridas, conseqüentemente possuem muito mais demanda por nutrientes e outros fatores limitantes para o crescimento dessas comunidades. Ainda, apesar de a vinhaça ter se mostrado um efluente tóxico para as algas, é teorizado que os microrganismos presentes na própria vinhaça, na água dos mesocosmos e até as próprias algas podem ter tirado vantagem das substâncias presentes na vinhaça, que apesar de ter baixo pH e alta corrosividade, possui uma série de nutrientes que são importantes para o desenvolvimento e crescimento celular, como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e metais essenciais (Tabela 5), reduzindo assim, sua toxicidade. Por exemplo, Cassman et al. (2018) identificaram até 15 espécies de bactérias em vinhaças de cana-de-açúcar, dentre elas organismos com potencial desnitrificante. Estes microrganismos presentes na vinhaça possuem grande capacidade de metabolizar substratos (CIPRIANO et al., 2019), podendo modificar os processos do solo e da água da qual a vinhaça é aplicada e/ou descartada.

Além disso, a própria composição do meio-teste é diferente, fato que diferencia o crescimento celular nos controles do laboratório e controle do mesocosmos (ver Figura 13). Os controles do mesocosmos, apesar de qualitativamente apresentarem menor número de células, apresentaram maior complexidade celular e níveis de clorofila *a* em comparação com o controle laboratorial (Figura 14). Existem uma série de estudos presentes na literatura que demonstram que diferentes meios aos quais as algas são inseridas, com níveis diferenciados de pH, carbonatos, silicatos, microelementos e vitaminas, alteram a biomassa algal, níveis de clorofila *a* e teores de carboidratos e proteínas nas células (ver SUTKOWY; LENARCZYK; KŁOSOWSKI, 2019).

Com relação à toxicidade dos agrotóxicos, para 2,4-D, a partir dos valores de  $CE_{50}$  e  $CI_{50}$  pode-se constatar que *R. subcapitata* é sensível a este herbicida em altas doses (Tabela 6). O mesmo ocorre também para o sal de dietanolamina de 2,4-D (Nº CAS 5742198) e a amina de 2,4-D (Nº CAS 2008391), com valores de  $CE_{50}$  de 11 e 51 mg/L, respectivamente. Outros herbicidas mimetizadores de auxinas apresentam valores variados dependendo do *endpoint* avaliado, do tempo de duração de teste e do tipo de substância (ingrediente ativo ou formulação). Por exemplo, o herbicida MCPA possui valores de  $CE_{50}/CI_{50}$  para o ingrediente ativo com relação a abundância que variam de 1.94 a 18.4 mg/L (CAUX; MÉNARD; KENT, 1996; MA et al., 2006; YEH; CHEN, 2006). Mas para uma formulação, a toxicidade foi muito maior com relação a abundância  $CI_{50-4d} = 0.62$  mg/L e muito menor para o *endpoint* de atividade fotossintética  $CI_{50-4d} = 71$  mg/L (YEH; CHEN, 2006). Para Picloram, o valor de CENO para a biomassa foi de 25 mg/L no estudo de Fairchild et al. (1997), enquanto para a taxa de crescimento populacional este valor foi de 100

mg/L no estudo de Garten e Frank (1984). No caso da abundância, este herbicida tem uma  $CE_{50-4d}$  de 22,7 mg/L (ST-LAURENT et al., 1992). Outros, não possuem muito estudos na literatura, como por exemplo o herbicida Dicamba (Nº CAS 1918009), com apenas o valor de nível de efeito observado (NOEL, em inglês) de 3,7 mg/L disponível na base de dados da US EPA (1992).

No mesmo sentido, para 2,4-D, avaliações com outros *endpoints* além de biomassa, abundância e taxa de crescimento populacional, como o presente trabalho e Moreira et al. (2020), não foram encontrados na pesquisa bibliográfica até o presente momento. Para estudos em modelos ecossistêmicos ou com amostras de mesocosmos isso não é diferente, tanto para 2,4-D como para os outros herbicidas mimetizadores de auxinas.

Situação similar ocorre para fipronil, pois além do valor de  $CE_{50}$  obtido pela US EPA (1992), apenas resultados apresentados nesta pesquisa e o de Moreira et al. (2020) avaliam os efeitos do inseticida diretamente para *R. subcapitata*. É claro que como não tem um mecanismo de ação direto para organismos fotossintetizantes a ausência de estudo é mais plausível que no caso de 2,4-D.

No entanto, para os outros dois inseticidas qualificados pela IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) como bloqueadores dos canais de cloro mediados pelo GABA, clordano e endosulfan (IRAC, 2022), as concentrações de efeito são bem menores que as obtidas para 2,4-D e outros herbicidas mimetizadores de auxinas. Para clordano, o  $CE_{50-4d}$  obtido por Richter (1982) foi de 0,36 mg/L. Para endosulfan, o valor foi próximo com o  $CE_{50-4d} = 0,42$  mg/L e CENO e CEO de 0,13 e 0,22, respectivamente (DELORENZO et al., 2002).

#### 5.4. Conclusão

O presente estudo mostrou que *R. subcapitata* é sensível a ambos os agrotóxicos avaliados em altas doses. No caso do herbicida 2,4-D, o valor de  $CI_{50-96 h} = 65$  mg/L está muito acima das concentrações reportadas em corpos d'água no Brasil (máximas de 465 µg/L para o fipronil e 366,6 µg/L para o 2,4-D). Os valores de CENO e CEO para a inibição de crescimento e a taxa de crescimento específico foram de 50 mg/L e 100 mg/L e 200 mg/L e 400 mg/L, respectivamente.

Situação similar ocorreu para o inseticida fipronil, embora não tenha sido possível obter o  $CI_{50-96 h}$ , pois a ausência de toxicidade foi até o limite máximo de solubilidade definido pela IUPAC = 3,78 mg/L. Sendo assim, os valores definidos para CENO, CEO e  $CI_{50-96 h}$  tanto para a densidade como para o crescimento foram de 1 mg/L, 1,5 mg/L e > 3,78 mg/L, respectivamente.

Com relação aos experimentos com as concentrações utilizadas em mesocosmos e com as amostras coletadas, as concentrações aplicadas estavam bem abaixo dos valores de toxicidade para

ambos os agrotóxicos, sendo assim, os resultados obtidos já eram esperados. No entanto, para os outros parâmetros mais sensíveis (como tamanho, complexidade e clorofila *a*), esperava-se algum tipo de efeito a partir dos resultados obtidos em Moreira et al. (2020), já que as concentrações utilizadas neste estudo estavam dentro do intervalo das concentrações-teste dos experimentos desta pesquisa.

Para a vinhaça, foram verificados resultados diferentes nos dois experimentos, com a vinhaça sendo extremamente tóxica quando aplicada no meio de cultura padronizado para as algas e sem diferenças estatísticas com relação ao controle dos mesocosmos nos testes com as amostras ambientais. Tanto estes resultados, como os obtidos para os agrotóxicos que divergiram dos obtidos no estudo de Moreira et al. (2020), demonstram a importância da composição do meio biótico e abiótico para a obtenção de resultados ecotoxicológicos. Ainda, demonstra que experimentos laboratoriais podem não só subestimar como superestimar efeitos em sistemas mais complexos, evidenciando a relevância de experimentos em conjunto para uma melhor análise dos efeitos tóxicos de substâncias.

Outro ponto relevante para os estudos com *R. subcapitata*, é que através dos estudos disponíveis na literatura, verificou-se a ausência da avaliação de outros *endpoints* além de densidade e crescimento da população. Avaliar outros aspectos celulares das algas poderia colaborar para a previsão de efeitos de concentrações relevantes ambientalmente.

Além disso, verificou-se através dos estudos disponíveis na literatura que *R. subcapitata* é mais sensível aos inseticidas inibidores dos canais de cloro, como o fipronil, do que para os herbicidas mimetizadores de auxinas, como 2,4-D. Sendo assim, é importante avaliar as substâncias mais frequentemente utilizadas e reportadas no ambiente, independente se o mecanismo de ação é voltado para aquela classe de organismos ou não. Para a vinhaça, é preciso estudos mais aprofundados para definir os critérios do potencial tóxico para *R. subcapitata*.

## Referências

ABNT. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**. Disponível em: <<https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/9890/abnt-nbr13373-ecotoxicologia-aquatica-toxicidade-cronica-metodo-de-ensaio-com-ceriodaphnia-spp-crustacea-cladocera>>.

ABNT. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)**. Disponível em: <<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=391089>>.

AFNOR, A. F. de N. **Essais des eaux. Determination de línhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme experimentale T90-304.**, 1980.

ANDERSEN, R. A. **Algae | Definition, Characteristics, Classification, Examples, & Facts | Britannica**. Disponível em: <<https://www.britannica.com/science/algae>>. Acesso em: 5 mar. 2022.

ARORA, M.; SAHOO, D. Green Algae. In: SAHOO, D.; SECKBACH, J. (Ed.). **The Algae World**. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. p. 91–120.

ARUOJA, V. et al. Toxicity of Nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to Microalgae *Pseudokirchneriella Subcapitata*. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 4, p. 1461–1468, Fevereiro 2009.

ASLIM, B.; OZTURK, S. Toxicity of Herbicides to Cyanobacterial Isolates. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 3, p. 381–384, maio 2009.

BAIRD, D. J. et al. The Daphnia bioassay: a critique. (M. Munawar et al., Eds.) Em: Environmental Bioassay Techniques and their Application, Dordrecht. **Anais...** Dordrecht: Springer Netherlands, 1989.

BRASIL, B. S. A. F.; GARCIA, L. C. Microalgas: alternativas promissoras para a indústria. **Embrapa Agroenergia**, v. 10, p. 6–11, 2016.

CARPENTER, S. R. Submersed Vegetation: An Internal Factor in Lake Ecosystem Succession. **The American Naturalist**, v. 118, n. 3, p. 372–383, 1981.

CARPENTER, S. R. et al. Nonpoint Pollution of Surface Waters with Phosphorus and Nitrogen. **Ecological Applications**, v. 8, n. 3, p. 559–568, 1998.

CASSMAN, N. A. et al. Genome-resolved metagenomics of sugarcane vinasse bacteria. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 48, 22 fev. 2018.

CAUX, P. Y.; MÉNARD, L.; KENT, R. A. Comparative Study of the Effects of MCPA, Butylate, Atrazine, and Cyanazine on *Selenastrum Capricornutum*. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 92, n. 2, p. 219–225, 1996.

CIPRIANO, M. A. P. et al. Bacterial community composition and diversity of two different forms of an organic residue of bioenergy crop. **PeerJ**, v. 7, p. e6768, 18 abr. 2019.

DELORENZO, M. E. et al. Toxicity and Bioconcentration Potential of the Agricultural Pesticide Endosulfan in Phytoplankton and Zooplankton. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 173–181, fev. 2002.

DOS SANTOS, R. R. et al. Cultivation of *Spirulina Maxima* in Medium Supplemented with Sugarcane Vinasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 38–48, 1 mar. 2016.

FAIRCHILD, J. F. et al. Comparative Sensitivity of *Selenastrum Capricornutum* and *Lemna Minor* to Sixteen Herbicides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 353–357, maio 1997.

FRITSCH, F. E. Present-Day Classification of Algae. **Botanical Review**, v. 10, n. 4, p. 233–277, 1944.

GARTEN, J.; FRANK, M. L. **Comparison of toxicity to terrestrial plants with algal growth inhibition by herbicides**. Oak Ridge National Lab., TN (USA), 1 out. 1984. Disponível em: <<https://www.osti.gov/biblio/6352877>>. Acesso em: 11 fev. 2022.

GEBARA, R. C. et al. Zinc and Aluminum Mixtures Have Synergic Effects to the Algae *Raphidocelis Subcapitata* at Environmental Concentrations. **Chemosphere**, v. 242, p. 125231, mar. 2020.

GOLLO, A. L. **Development of a plant culture medium composed with vinasse originated from Haematococcus pluvialis culture**. 2015. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/41254>>. Acesso em: 12 fev. 2022.

GONZÁLEZ-PLEITER, M. et al. Toxicity of Five Antibiotics and Their Mixtures towards Photosynthetic Aquatic Organisms: Implications for Environmental Risk Assessment. **Water Research**, v. 47, n. 6, p. 2050–2064, abril 2013.

GUARIEIRO, M. S. **Utilização da vinhaça no cultivo da microalga *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) Silva visando à produção de biomassa aplicada ao mercado de biodiesel**. 2019. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2019. Disponível em: <[https://repositorio.ufes.br/bitstream/10/11115/1/tese\\_12872\\_Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Final%20%28May%29%20pdf%20%281%29.pdf](https://repositorio.ufes.br/bitstream/10/11115/1/tese_12872_Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Final%20%28May%29%20pdf%20%281%29.pdf)>.

IRAC, I. R. A. C. **The IRAC mode of action classification online**. Disponível em: <<https://irac-online.org/modes-of-action/>>. Acesso em: 6 mar. 2022.

ISSG, I. S. S. G. **Myriophyllum spicatum**. Disponível em: <<http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=278>>. Acesso em: 11 fev. 2022.

IUPAC (2019). **Fipronil (Ref: BAS 3501): Environmental fate**. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/316.htm>. Acesso 19/01/2021.

KADIOĞLU, A.; ALGUR, Ö. F. Tests of Media with Vinasse for *Chlamydomonas Reinhardii* for Possible Reduction in Vinasse Pollution. **Bioresource Technology**, v. 42, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 1992.

LORENZ, M. **SAG 61.81 *Raphidocelis subcapitata* SAG**, 2016. Disponível em: <[https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str\\_number=61.81](https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=61.81)>. Acesso em: 5 mar. 2022.

MA, J. et al. Toxicity Assessment of 40 Herbicides to the Green Alga *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 3, p. 456–462, mar. 2006.

MARQUES, S. S. I. et al. Growth of *Chlorella vulgaris* on Sugarcane Vinasse: The Effect of Anaerobic Digestion Pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 1933–1943, 1 dez. 2013.

MOHR, S. et al. Effects of Toxicants with Different Modes of Action on *Myriophyllum spicatum* in Test Systems with Varying Complexity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 97, p. 32–39, 1 nov. 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, 2020.

MORENO-GARRIDO, I.; ARAÚJO, C. **Toxicity bioassays on benthic diatoms**. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/282719885\\_Toxicity\\_Bioassays\\_on\\_Benthic\\_Diatoms](https://www.researchgate.net/publication/282719885_Toxicity_Bioassays_on_Benthic_Diatoms). Acesso em: 06 mar. 2022.

OECD. **Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test**. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2011.

OVERMYER, J. P. et al. Toxicity of fipronil and its enantiomers to marine and freshwater non-targets. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 42, n. 5, p. 471–480, 11 jun. 2007.

OZTURK, L.; DEMIR, Y. The Effects of Vinasse on Some Growth Parameters of Algae. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 10, n. 10, p. 766–771, 6 jan. 2001.

QU, H. et al. Enantioselective Toxicity and Degradation of the Chiral Insecticide Fipronil in *Scenedesmus obliquus* Suspension System. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 11, p. 2516–2521, nov. 2014.

RIBEIRO, L. I. S. **Comparação de metodologias utilizando *Daphnia sp.* como bioindicador de toxicidade crônica e sua aplicabilidade em *Daphnia similis***. 2017. Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, BR., 2017. Disponível em: <<https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/monografias/2017/MEA17006.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

RICHTER, J. E. **Results of algal toxicity tests with priority pollutants**. [s.l.] Center for Lake Superior Environmental Studies, 1982. Disponível em: <[https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference\\_id/5353228](https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/5353228)>. Acesso em: 6 mar. 2022.

ROMANHOLO FERREIRA, L. F. et al. Evaluation of Sugar-Cane Vinasse Treated with *Pleurotus Sajor-Caju* Utilizing Aquatic Organisms as Toxicological Indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132–137, 1 jan. 2011.

SANCHES, S. M. et al. Presença Da Toxina Microcistina Em Água, Impactos Na Saúde Pública e Medidas de Controle. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.

33, n. 2, 1 abr. 2012. Disponível em:

<<https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/287>>. Acesso em: 5 mar. 2022.

SANTANA, H. et al. Microalgae Cultivation in Sugarcane Vinasse: Selection, Growth and Biochemical Characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133–140, 1 mar. 2017.

SANTOS, M. A. P. F.; VICENSOTTI, J.; MONTEIRO, R. T. Sensitivity of Four Test Organisms (*Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) to NaCl: an Alternative Reference Toxicant. **Journal of The Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, 1 jan. 2007.

SARMENTO, H. et al. Abundance and Distribution of Picoplankton in Tropical, Oligotrophic Lake Kivu, Eastern Africa. **Freshwater Biology**, v. 53, n. 4, p. 756–771, 2008.

SILVA, L. C. M. da. **Efeito da aclimação termal sobre a sensibilidade e toxicidade termo-dependente ao Glifosato para *Ceriodaphnia silvestrii***. 2017. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-09032017-142632/pt-br.php>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

SIMMONS, J. A. Toxicity of Major Cations and Anions (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, and SO<sup>4</sup>) to a Macrophyte and an Alga. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1370–1374, 2012.

SPRAGUE, J. B. Factors that modify toxicity. Em: **Fundamentals of aquatic toxicology**. Rand, G. M., Petrocelli, S. R. ed. Washington, DC: Hemisphere, 1985. p. 124–163.

STATSOFT INC. 2004. Statistica: data analysis software system, version 7. Tulsa. Available at: <<http://www.statsoft.com/>>.

ST-LAURENT, D. et al. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. **Environmental toxicology and water quality (USA)** (7) 35 - 48, 1992.

SUTKOWY, M.; LENARCZYK, J.; KŁOSOWSKI, G. Effect of Culture Medium on the Growth of Microscopic Algae (Chlorophyceae) Biomass Showing Biosorption Potential: A Case Study *Pseudopediastrum Boryanum*. **Phycological Research**, v. 67, n. 2, p. 112–119, 2019.

TOUSOVA, Z. et al. European Demonstration Program on the Effect-Based and Chemical Identification and Monitoring of Organic Pollutants in European Surface Waters. **The Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 1849–1868, 1 dez. 2017.

US EPA, U. S. E. P. A. **Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB))** Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C.: 1992.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2012. **Ecological effects test guidelines: algal toxicity**. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Washington, D. C. EPA 712-C-006.

VANDERLEI, M. R. **Efeitos dos agrotóxicos Kraft®36EC e Score®250EC (e seus princípios ativos) em ecossistemas aquáticos: análises comparativas e ecossistêmicas**. 2015. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil, 2015. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-30052016-102950/publico/DissertacaoMarinaReghiniVanderlei.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

VIEIRA, B. H. **Efeito do agrotóxico Vermitec no fitoplâncton: um estudo laboratorial e “in situ”**. 2010. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-22032010-155059/pt-br.php>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

WOJCIECHOWSKI, J. **Isolamento e cultivo de microalgas**. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/270452268\\_Isolamento\\_e\\_cultivo\\_de\\_microalgas](https://www.researchgate.net/publication/270452268_Isolamento_e_cultivo_de_microalgas). Acesso em: 25 jan. 2021.

WOOD, R. J. et al. How Benthic Diatoms within Natural Communities Respond to Eight Common Herbicides with Different Modes of Action. **The Science of the Total Environment**, v. 557–558, p. 636–643, 1 jul. 2016.

YEH, H. J.; CHEN, C. Y. Toxicity Assessment of Pesticides to *Pseudokirchneriella subcapitata* under Air-Tight Test Environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 131, n. 1–3, p. 6–12, 17 abr. 2006.



## 6. CAPÍTULO II – Ensaio de toxicidade com *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea)

### 6.1. Introdução

O zooplâncton compreende uma variedade de organismos heterotróficos do plâncton que engloba crustáceos, larvas de insetos, protozoários e vermes. Estes organismos podem ser carnívoros, herbívoros, onívoros e detritívoros e são importantes constituintes da cadeia trófica aquática por serem a fonte de alimento de muitas espécies e os consumidores do fitoplâncton (SANTOS, 2020). Dentro dos crustáceos está a ordem Cladocera, um dos grupos mais representativos do plâncton de águas continentais, com a maior parte dos organismos apresentando hábito herbívoro filtrador, atuando na base da cadeia alimentar como consumidores primários (ROCHA; SANTOS-WISNIEWSKI; MATSUMURA-TUNDISI, 2011).

Com aproximadamente 620 espécies conhecidas em todo o mundo (DECAESTECKER; DE MEESTER; MERGEAY, 2009), os cladóceros ocupam uma diversidade de habitats de água doce, em sua maioria ambientes lênticos, que incluem desde pequenas poças até grandes reservatórios. No entanto, podem ser encontrados em ambientes lóticos, principalmente em áreas de remanso. No Brasil, existem cerca de 150 espécies, com 96 delas amostradas no estado de São Paulo (ROCHA; SANTOS-WISNIEWSKI; MATSUMURA-TUNDISI, 2011).

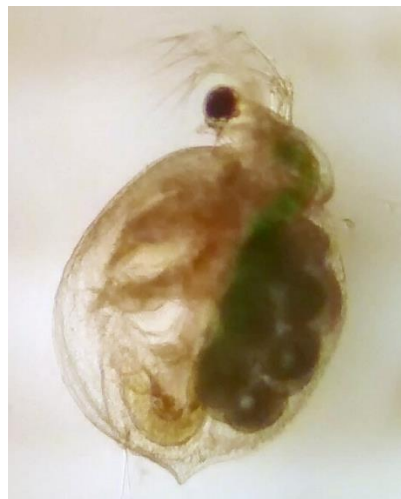
Dentre os cladóceros, a família Daphniidae é um dos grupos do zooplâncton mais estudado na ecotoxicologia aquática, com destaque para os gêneros *Daphnia* e *Ceriodaphnia*. Estes organismos são importantes bioindicadores de qualidade ambiental por sua rápida e sensível resposta às variações no sistema aquático, que podem ser provocadas por fatores naturais, como por exemplo, flutuações de temperatura (KHAN; KHAN, 2008), pH (GHAZY; HABASHY; MOHAMMADY, 2011) e oxigênio dissolvido (NEBEKER et al., 1992) ou por fatores antropogênicos, como a contaminação por agrotóxicos (ROBLES-VARGAS, 2015).

Além disso, como são organismos pequenos, geralmente entre 0,2 e 3 mm, podem ser facilmente cultivados em laboratório. Por serem organismos de ciclo de vida curto, são de fácil manutenção para testes de toxicidade. A maioria dos dafinídeos, em condições favoráveis, é partenogênica cíclica, ou seja, reproduzem-se assexuadamente gerando uma prole geneticamente similar (DECAESTECKER; DE MEESTER; MERGEAY, 2009), o que garante uma boa replicabilidade para avaliações ecotoxicológicas.

Essas avaliações são geralmente realizadas com espécies padronizadas internacionalmente, principalmente *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia* (US EPA, 2020). No entanto, nos últimos anos existe um esforço para a utilização de espécies nativas na avaliação da ecotoxicidade em ambientes tropicais (KWOK et al., 2007; SANCHEZ-BAYO; HYNE, 2011; WANG; KWOK; LEUNG, 2019), principalmente pela maior sensibilidade e representatividade ambiental (MOREIRA et al., 2014; PHAM; BUI, 2018). Neste sentido, para o desenvolvimento desta pesquisa foi selecionada a espécie *Ceriodaphnia silvestrii* como representante do zooplâncton nativo.

*C. silvestrii* é uma espécie amplamente distribuída pela América do Sul e frequentemente encontrada no Brasil nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Goiás e Distrito Federal (ELMOOR-LOUREIRO, 1997; ROCHA, O; GUNTZEL, A. M., 2000; ROCHA; SANTOS-WISNIEWSKI; MATSUMURA-TUNDISI, 2011), sendo a primeira espécie de cladóceros nativo padronizado para testes ecotoxicológicos no país (ABNT, 2017). O gênero *Ceriodaphnia* possui a vantagem de responder aos efeitos crônicos mais rapidamente do que as espécies de dáfias, oito dias ao invés de 21, além do menor tamanho que em muitas vezes confere maior sensibilidade (HAYASAKA et al., 2012b). *C. silvestrii*, além disso, é mais sensível que *C. dubia*, espécie de clima temperado, para uma série de substâncias (LAMEIRA, 2012; OLIVEIRA NETO; BOTTA-PASCHOAL, 2020; SILVA; DAAM; GUSMAO, 2020).

**Figura 15.** Espécie de cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*



**Fonte:** Silva, L. C. M. (2017)

Sendo assim, considerando a problemática da utilização dos agrotóxicos na produção sucroalcooleira, juntamente com a necessidade crescente da obtenção de dados ecotoxicológicos em condições tropicais usando espécies nativas, procurou-se nesta etapa da

pesquisa avaliar a toxicidade dos agrotóxicos DMA<sup>®</sup> (i.a. 2,4-D) e Regent<sup>®</sup> (i.a. fipronil) e da vinhaça da cana-de-açúcar, isolados e em mistura, sobre o cladóceros nativo da América do sul *C. silvestrii* a partir da análise dos efeitos letais, subletais e de pós-exposição.

## 6.2. Material e Métodos

### 6.2.1. Organismo-teste e condições da cultura

Os organismos utilizados nos testes de toxicidade foram obtidos nas culturas contínuas estabelecidas em laboratório (NEEA/CRHEA/USP), e os procedimentos de cultivo e testes de toxicidade seguiram as recomendações da norma ABNT 13373:2017 (ABNT, 2017).

As culturas de *C. silvestrii* foram mantidas sob temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C) e fotoperíodo (12:12 horas claro/escuro) em água reconstituída com pH na faixa de 7,0-7,6, condutividade de 160 µS/cm e dureza de 40-48 mg/L (como CaCO<sub>3</sub>). Os organismos foram alimentados diariamente com a alga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* (10<sup>5</sup> células/mL), cultivada em meio LC Oligo (AFNOR, 1980) e com um suplemento alimentar (1 ml/L) composto de uma suspensão contendo levedura (0,5 %) e ração fermentada de peixe (0, 5%). Testes de toxicidade aguda com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl) foram realizados mensalmente para avaliar a condição fisiológica dos organismos (ABNT, 2017).

### 6.2.2. Testes de toxicidade aguda em laboratório: agrotóxicos e vinhaça, isolados e em mistura

Inicialmente, testes preliminares de toxicidade aguda foram realizados para definir a faixa de sensibilidade das espécies para a exposição isolada aos agrotóxicos e a vinhaça. Para bioensaios definitivos, um controle e seis concentrações (100, 125, 150, 175, 200 e 225 mg i.a./L) do herbicida foram preparados a partir de uma solução estoque de 6,7 g i.a./L. Para o inseticida, um controle e cinco concentrações (0,8; 1,6; 3,2; 6,5 e 13 µg i.a./L) foram preparados a partir de uma solução estoque de 1,3 mg i.a./L. Para a vinhaça, um controle e cinco diluições com porcentagens de vinhaça foram preparadas a partir da vinhaça *in natura* (0,2; 0,4; 0,45; 0,5 e 0,6 %). Todos os testes de toxicidade aguda foram feitos em quadruplicada, com cinco recém-nascidos por réplica (6-24 horas de vida), em copo plástico de polipropileno contendo 10 mL de solução de teste por 48 horas, sem alimentação, 12:12 h claro/escuro e temperatura de 25 °C  $\pm$  2 °C. Cada experimento foi realizado três vezes com diferentes gerações de neonatas e o

*endpoint* avaliado foi a imobilidade para a obtenção da CE<sub>50-48h</sub> média (concentração efetiva que causa efeito agudo em 50 % da população).

Os testes de toxicidade com mistura dos agrotóxicos e/ou vinhaça foram realizados em duas etapas. A primeira etapa consistiu somente no uso dos agrotóxicos, através do método *full* fatorial (CASSEE et al., 1998), com 30 combinações das concentrações utilizadas nos testes isolados e um controle, com três repetições cada. Para a segunda etapa, os agrotóxicos e a vinhaça foram combinados com quatro concentrações de cada um e um controle, totalizando 28 combinações com três réplicas. Em ambas as etapas o *endpoint* foi a imobilidade (CE<sub>50-48h</sub>). Além disso, testes de toxicidade com as formulações e a vinhaça individualmente e suas misturas fatoriais foram realizados simultaneamente para evitar qualquer influência de eventuais diferenças na sensibilidade de *C. silvestrii* e condições experimentais (PAVLAKI et al., 2011). Os parâmetros físicos e químicos pH (Orion Modelo 145 A+), oxigênio dissolvido (OD) (YSI 55) e condutividade (Micronal B374) foram verificados no início e no final de cada experimento.

### **6.2.3. Testes crônicos em laboratório: produtos isolados e em mistura**

Para os testes de toxicidade crônica com as formulações isoladas, foram selecionadas cinco concentrações de cada substância com base nos valores de CE<sub>10</sub> dos testes agudos. Concentrações de 40, 50, 60, 70 e 80 mg i.a./L e um controle foram usadas para o herbicida enquanto para o inseticida concentrações de 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 e 2 µg i.a./L foram testadas. Em ambos, foram utilizadas as mesmas soluções estoque dos testes agudos. Para a vinhaça, as porcentagens utilizadas nos testes crônicos foram de 0,025, 0,05, 0,1, 0,15 e 0,20 %. Em cada concentração testada foram consideradas 10 réplicas contendo uma neonata entre 6 e 24 horas de vida. A duração dos testes foi de oito dias e os organismos foram alimentados e mantidos nas mesmas condições (temperatura, fotoperíodo, meio) descritas anteriormente para manutenção da cultura. As soluções de teste foram renovadas a cada 48 horas após o registro do número de adultos e recém-nascidos sobreviventes. Os parâmetros avaliados foram CE<sub>50</sub> (reprodução), CE<sub>20</sub>, CE<sub>10</sub>, CENO (Concentração de efeito não observado) e CEO (Concentração de efeito observado). A idade da primeira reprodução, a porcentagem de sobrevivência e o número de neonatas por fêmea foram observados diariamente sob um estereomicroscópio, e os valores de CE de oito dias foram calculados com base na fecundidade. A taxa intrínseca de aumento populacional ( $r$ ) foi calculada usando a equação 2 de Euler (MARINHO et al., 2019):

$$1 = \sum_{x=0}^n e^{-rx} l_x m_x \quad (2)$$

Onde, “r” é a taxa intrínseca do aumento da população ( $\text{dia}^{-1}$ ), “x” é a idade dos organismos (dias), “ $l_x$ ” é a probabilidade de sobrevivência na idade “x”, and “ $m_x$ ” é o número de neonatas na idade x.

Para os testes crônicos com mistura, assim como nos testes agudos, duas etapas foram realizadas, sendo que na primeira foi feita a avaliação da mistura dos agrotóxicos e na segunda a avaliação da mistura das três substâncias. Os testes de toxicidade da primeira etapa seguiram o método *partial fixed-ratio* (CASSEE et al., 1998), com a avaliação isolada de cada composto e 23 combinações binárias com cinco réplicas por concentração. A segunda etapa seguiu a lógica dos testes agudos de mistura ternária, totalizando 28 concentrações, sendo 16 combinações da mistura. Os parâmetros de qualidade da água (pH, condutividade e oxigênio dissolvido) foram verificados no início, final e em cada renovação, para garantir que estivessem conforme recomendado para a espécie.

#### 6.2.4. Testes de toxicidade aguda em mesocosmos

Os testes de toxicidade aguda em mesocosmos foram baseados na metodologia utilizada por Mendes (2015). Para tal, três réplicas com 10 neonatas cada (6-24 horas de vida) foram inseridas em cada mesocosmo em potes plásticos atóxicos com capacidade de 50 mL revestidos com malha de 45  $\mu\text{m}$  (Figura 16). A câmara *in situ* garantiu que os cladóceros entrassem em contato com os contaminantes e fontes de alimentos ao mesmo tempo que impediu a entrada de predadores. Os organismos foram expostos em mesocosmos em cinco tempos diferentes: no dia da contaminação, 3 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias após a contaminação. Os testes tiveram a duração de 48 horas e o *endpoint* foi a imobilidade, verificada em laboratório com o auxílio de luz branca luminescente.

**Figura 16.** Armadilhas inseridas nos mesocosmos para os testes de toxicidade aguda com *C. silvestrii*



**Fonte:** Allan Ogura (2019).

### 6.2.5. Testes de toxicidade aguda e crônica com amostras de água dos mesocosmos

Para realizar os testes de toxicidade em laboratório, um litro de água de cada mesocosmos foi coletado e filtrado com o auxílio de uma malha de 45  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, o volume foi distribuído segundo as recomendações de cada teste de toxicidade assim como foi realizado para os testes laboratoriais com as formulações. Os procedimentos e *endpoints* pra os testes agudos e crônicos são os mesmos descritos nos tópicos 6.2.2 e 6.2.3. As coletas amostrais utilizadas para os testes em laboratório foram pré-contaminação (T0), logo após a contaminação (T1), 3 dias (T2), 7 dias (T3), 14 dias (T4), 21 dias (T5), 30 dias (T6), 45 dias (T7) e 75 dias (T8).

Os parâmetros físicos e químicos foram verificados ao final de cada experimento e em cada renovação da solução-teste. Outros parâmetros essenciais de avaliação de amostras ambientais também foram analisados em todas as coletas dos mesocosmos como nutrientes (método descrito em APHA; AWWA; WEF, 2018), dureza (titulação) e turbidez (sonda multiparâmetros YSI - ProDSS).

### 6.2.6. Testes pós-exposição: alimentação com *R. subcapitata* e reprodução

O teste de alimentação foi realizado através da exposição dos organismos que passaram pelo teste de toxicidade aguda em mesocosmos e com as amostras de mesocosmos em laboratório, a uma quantidade de alimento conhecida (*R. subcapitata*) para verificar efeitos na taxa de alimentação, ocasionado pelas substâncias testes. Para isso, ao finalizar os testes de

toxicidade, 10 organismos de cada mesocosmo ou tratamento foram transferidos para frascos âmbar com água de cultivo e uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL. Estes frascos foram colocados em uma câmara giratória de baixa intensidade para impedir que as algas sedimentassem (Figura 16). Os experimentos ocorreram na ausência de luz e tiveram a duração de 4 horas. O *endpoint* foi a taxa de alimentação verificada através da diferença da concentração algácea em câmara Neubauer. Esta avaliação foi fundamentada no método utilizado por McWilliam e Baird (2002).

**Figura 17.** Experimento de taxa de alimentação de *C. silvestrii* em câmara giratória



**Fonte:** Laís C. M. da Silva (2019).

Dois testes pós-exposição de reprodução foram realizados com *C. silvestrii*. O primeiro foi feito durante os testes preliminares do herbicida DMA<sup>®</sup> 806 BR onde duas concentrações testadas não apresentaram produção de neonatas e nem a imobilidade significativa dos organismos. Após o final do teste crônico com o herbicida, as fêmeas que estavam nas concentrações de 90 e 110 mg i.a./L foram transferidas para recipientes com água de cultivo para serem acompanhadas por mais sete dias. O segundo teste foi realizado com os organismos que foram expostos ao teste agudo nos mesocosmos. Após a retirada das armadilhas dos mesocosmos, cinco fêmeas de cada mesocosmo (tanques com 90 % de sobrevivência) ou tratamento (no caso de poucas neonatas sobreviventes) foram transferidas para o meio não contaminado para a realização do teste crônico de reprodução. Os *endpoints* e procedimentos de ambos os testes foram os mesmos descritos na sessão 6.2.3.

### 6.2.7. Análise estatística

Os valores de CE<sub>50</sub>, CE<sub>20</sub>, e CE<sub>10</sub> dos testes agudos e crônicos com as formulações isoladas foram analisados por regressão não linear usando a curva logística de três parâmetros através do software Statistica versão 7.0 (STATSOFT, 2004). Para os valores dos testes

crônicos, analisou-se diferenças significativas entre controles e tratamentos para idade de primeira reprodução, fecundidade e taxa intrínseca de aumento populacional. A normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade dos dados (Levene) foram verificadas e as diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA). Isso foi seguido pelo teste post-hoc de Dunnett no caso de dados que atendiam aos critérios de normalidade e homoscedasticidade. Para dados que não atendiam a esses requisitos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Dunn Method.

As misturas binárias das formulações agudas e crônicas foram analisadas por meio dos modelos de adição de concentração conceitual (CA) e ação independente (IA) usando a ferramenta MIXTOX (JONKER et al., 2005). A análise foi então estendida, como descrito em Jonker et al. (2005), e os três desvios dos modelos de referência interações sinérgicas/antagônicas (S/A), desvio-dependente da razão da dose (DR) e dependente do nível da dose (DL) foram modelados pela adição de dois parâmetros (“a” e “b”). Detalhes adicionais sobre as funções de desvio podem ser obtidos em Jonker et al. (2005). Para as misturas ternárias agudas e crônicas, as diferenças estatísticas foram avaliadas a partir de ANOVA com os mesmos procedimentos utilizados para a avaliação crônica isolada.

Para os testes realizados nos mesocosmos ou com a amostra dos mesocosmos em laboratório uma ANOVA com design misto (*repeated measures ANOVA*) foi utilizada considerando o tempo (dia de coleta em relação a contaminação) como um fator dentro da amostragem (*within-subjects*). A esfericidade das amostragens foi avaliada pelo teste de Mauchly. No caso de não conformidade ( $p < 0,05$ ) foi aplicada a correção de Greenhouse-Geisser para os graus de liberdade. As diferenças significativas entre os tratamentos e o tempo ( $p < 0,05$ ) foram observadas usando o teste post-hoc de Tukey HSD. No caso dos dados do teste de alimentação e pós-exposição, os procedimentos de ANOVA para os testes crônicos de laboratório (6.2.3) foram utilizados em ambos para analisar as diferenças significativas.

### **6.3. Resultados e Discussão**

#### **6.3.1. Testes agudos em laboratório: produtos isolados e em mistura**

Os testes de toxicidade aguda dos agrotóxicos isolados DMA<sup>®</sup> 806 BR (mg/L) (i.a. 2,4-D) e Regent<sup>®</sup> 800 WG (i.a. fipronil) mostraram EC<sub>50</sub>-48h (média ± DP) para *Ceriodaphnia silvestrii* de  $169 \pm 18$  mg i.a./L (Intervalo de Confiança (IC) 95 % 138 – 192 mg i.a./L) e  $3,9 \pm 0,50$  µg



i.a./L (IC 95 % 2,5 – 4,9 µg i.a./L), respectivamente. Para a vinhaça, a EC<sub>50</sub>-48h (média ± DP) foi de 0,46 ± 0,008 % de vinhaça na solução de teste (IC 95 % 0,44 – 0,48 %). A Figura 18 resume os resultados da sobrevivência de *C. silvestrii* nas três réplicas realizadas das substâncias testadas, enquanto os outros valores de CE são apresentados na Tabela 9. Com relação aos agrotóxicos, os resultados indicam que o inseticida fipronil foi mais tóxico (43 vezes) que o herbicida 2,4-D. Os valores de toxicidade aguda do 2,4-D para cladóceros encontrados na literatura variam de 20 a 422 mg/L, enquanto que para o fipronil e suas formulações, o intervalo de sensibilidade para outras espécies de cladóceros está entre 1 e 190 µg/L.

Para 2,4-D, a EFSA (2014) apresenta um valor de CE<sub>50</sub>-48h de 134,2 mg/L para *D. magna* a 20 °C em um teste de 48 horas, valor próximo a CL<sub>50</sub> de 135 mg/L obtido por Benijts Claus & Persoone (1975). Além disso, alguns estudos avaliaram o efeito agudo de 2,4-D apenas até um valor específico, como por exemplo, Crosby e Tucker (1966) e Sanders (1970), com valores de CE<sub>50</sub>-24h e CL<sub>50</sub>-48h > 100 mg/L para *D. magna*. Nelson e Roline (1998) também apresentaram seu resultado de CE<sub>50</sub>-48h > 422 mg/L para *Ceriodaphnia dubia*. Valores de CE e CL abaixo de 100 mg/L foram obtidos para *D. magna*, CL<sub>50</sub>-48h de 25 e 36,4 mg/L (ALEXANDER; GERSICH; MAYES, 1985) e para *Daphnia lumholtzi* LC<sub>50</sub>-48h de 20 mg/L (GEORGE; HINGORANI; RAO, 1982). Diferenças na toxicidade de um composto em espécies do mesmo grupo taxonômico podem ser explicadas devido às condições dos testes de laboratório, como tempo de exposição, constituição da água da cultura, dureza, fotoperíodo e temperatura (MOREIRA et al., 2014). Présing (1981), por exemplo, observou diferenças na toxicidade com mudanças na temperatura e no tempo de exposição de *D. magna* a 2,4-D. A toxicidade aumentou 16 % com a mudança da temperatura de 15 °C para 20 °C e ocorreu uma diferença de 47 % nos valores de CL<sub>50</sub> entre 24 e 96 horas. Milam et al. (2005) também avaliaram os efeitos de 2,4-D em *D. magna* e obtiveram uma CL<sub>50</sub>-24h média de 415,7 mg/L a 22 °C, enquanto Présing (1981) obteve um valor de CL<sub>50</sub>-48h de 417,8 mg/L a 20 °C. Para *C. dubia*, essa comparação também pode ser feita com os estudos de Milam et al. (2005) e Oris et al. (1991) que obtiveram valores de CL<sub>50</sub>-24h de 272,5 e CL<sub>50</sub>-48h de 236 mg/L, nos quais a temperatura média entre os dois estudos teve diferença de 3 °C. No presente estudo, para 2,4-D, os valores de sensibilidade obtidos para *C. silvestrii* estão dentro dos valores estabelecidos para as outras espécies de cladóceros, no entanto, são necessários mais estudos para descartar influências das características físicas e químicas, como a temperatura.

Para o fipronil, com os estudos disponíveis de toxicidade aguda, observamos que *D. magna* apresenta valores médios de CE<sub>50</sub>-48h e CL<sub>50</sub>-48h superiores a outros cladóceros. Com base

nos estudos encontrados para as espécies, calculamos uma média de 132 µg/L (US EPA, 1992; EFSA, 2006; NAKAGOME; NOLDIN; JR, 2006; HAYASAKA et al., 2012b), enquanto que para *D. pulex* e *C. dubia* a média é de 27,8 (STARK; VARGAS, 2005; HAYASAKA et al., 2012b) e 17,4 µg/L, respectivamente (KONWICK et al., 2005; WILSON et al., 2008; HAYASAKA et al., 2012b). Para dois outros cladóceros, *Ceriodaphnia reticulata* e *Moina macrocopa* foram encontrados valores de CE<sub>50-48h</sub> de 9 e 29 µg/L (HAYASAKA et al., 2012b). Com a média calculada para as espécies, pode-se notar que *D. magna* chega a ser cinco vezes mais resistente que as outras espécies. Hayasaka et al. (2012), ao avaliar a toxicidade do fipronil para cinco cladóceros, observaram que os valores de CE<sub>50-48h</sub> estavam relacionados ao tamanho dos organismos, sendo o gênero *Ceriodaphnia* o mais sensível.

Outra variável que provavelmente também está relacionada às variações de resposta é a temperatura. Para outros inseticidas como fenvalerato, cipermetrina, deltametrina e malation, a relação entre temperatura e toxicidade parece ser positiva para *D. magna* (RATUSHNYAK; ANDREEVA; TRUSHIN, 2005; WILLMING; QIN; MAUL, 2013). Nesse sentido, avaliações de toxicidades dependentes da temperatura com as espécies padrão também são necessárias para reduzir as lacunas em relação a toxicidade de fipronil para cladóceros. Para *C. silvestrii*, um estudo realizado por Silva et al. (2020) mostrou que ela é mais sensível a efeitos tóxicos quando há alterações de temperatura. Além disso, a espécie parece ser mais sensível que *C. dubia*, espécie de clima temperado, comparando este trabalho com o realizado por Tsui e Chu (2003), ambos realizados com herbicidas a base de glifosato.

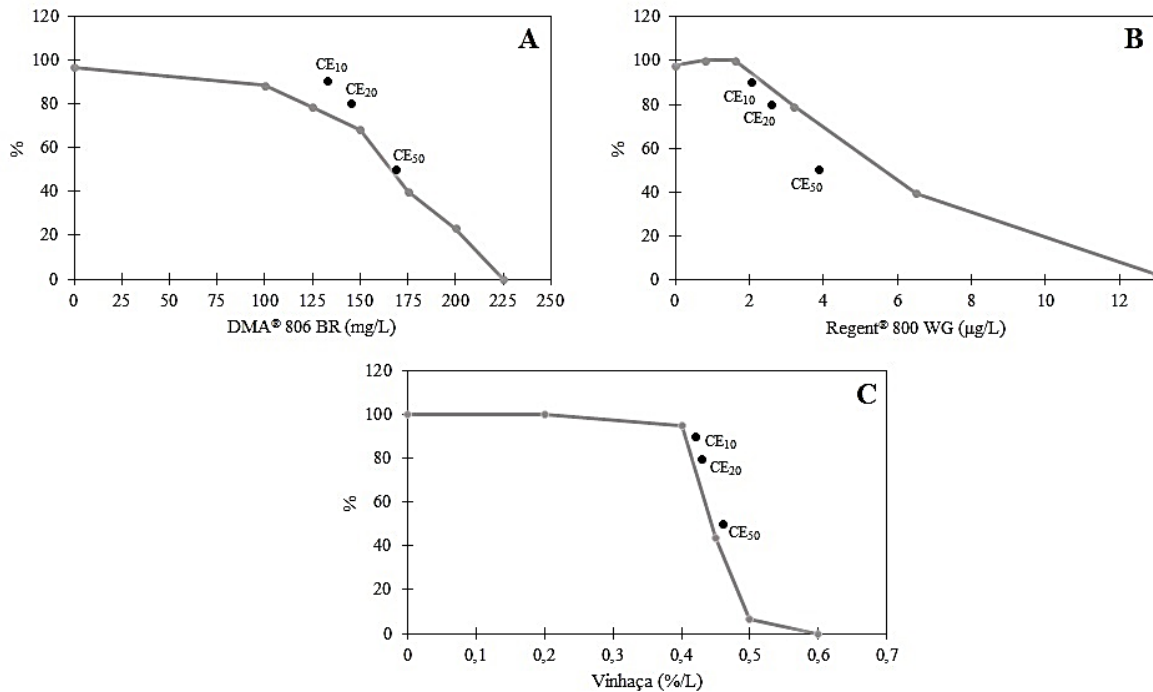
Neste estudo, *C. silvestrii* exposta ao fipronil a 25 °C foi a espécie mais sensível quando comparada a outros cladóceros. Em outros estudos realizados, *C. silvestrii* também demonstrou ser mais sensível que outras espécies de clima temperado como *D. magna* para substâncias como acetaminofeno, propranolol e diclofenaco (OLIVEIRA et al., 2018), bisfenol e nonilfenol (SPADOTO et al., 2018) e carbofurano e diurom (MANSANO et al., 2018). Neste sentido, já que o gênero *Ceriodaphnia* é considerado um bioindicador equivalente a *D. magna* em termos de avaliação de risco ambiental (VERSTEEG et al., 1997; PAKRASHI et al., 2013), utilizar espécies nativas para ensaios ecotoxicológicos pode ser crucial para uma melhor avaliação de risco ecológico em áreas tropicais contaminadas.

Com relação a vinhaça, os trabalhos encontrados na literatura avaliaram a toxicidade aguda com cladóceros a fim de comparar os efeitos tóxicos após algum tipo de processo de remediação do resíduo. Por exemplo, Botelho et al. (2012) avaliaram a toxicidade da vinhaça antes e depois da correção do pH para os cladóceros *C. dubia* e *D. magna*. Os valores de CL<sub>50-48h</sub> para a vinhaça sem correção de pH foram de 0,67 e 0,80 %, enquanto que com o pH corrigido para

6,5 foram de 2,99 e 5,62 %. Em nossos experimentos, o pH variou entre 4,52 e 7,60. Ele foi diretamente relacionado com o aumento da porcentagem da vinhaça, com todos os valores iniciais abaixo de 7, sendo que nas duas últimas porcentagens testadas (mais tóxicas) estes valores foram menores que 5.

Ferreira et al. (2011) avaliaram a toxicidade da vinhaça para os cladóceros *D. magna* e *D. similis* antes e após biorremediação com o fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB020. A toxicidade reduziu drasticamente para ambas as espécies, com CL<sub>50</sub>-48h de 66 % para *D. magna* e de 21 % para *D. similis*, enquanto que para a vinhaça pura os valores foram de 3,6 % e 2,2 %. Outro trabalho comparou a toxicidade da vinhaça após submetê-la a dois tipos diferentes de tratamento: um sistema foto-Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>) e um sistema biológico anaeróbico acoplado ao foto-Fenton (BARBA HO; GARCÍA, 2012). A toxicidade aguda para *Daphnia pulex* foi de 5,5 % para a vinhaça pura, 6,9 % para a vinhaça tratada com foto-Fenton e 16,7 % com o sistema anaeróbico acoplado. Paz-Pino et al. (2014) também avaliaram dois tratamentos na mesma linha que o trabalho anterior, sendo eles: pré-tratamento de eletro-dissolução de ferro e uma etapa de heterocoagulação com Ca (OH)<sub>2</sub> e um processo de digestão anaeróbica. Para vinhaça bruta obteve-se uma CL<sub>50</sub>-48h de 3,96 % para *D. pulex*, com o pré-tratamento a CL<sub>50</sub> aumentou cerca de 30 % comparada com a vinhaça *in natura* e após o tratamento completo o valor final foi de 11,53 %. Campos et al. (2014) também conseguiram uma boa taxa de redução de toxicidade para *D. similis* partindo de uma CE<sub>50</sub>-48h de 0,36 % para 25,5 % de vinhaça. Velásquez-Riaño et al. (2019) realizaram um estudo comparativo entre as espécies *Aliivibrio fischeri* e *D. magna* para determinar a mais sensível, e o cladóceros foi o mais sensível, com uma CE<sub>50</sub>-48h de 4,7 %. Comparando apenas os valores de CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> é difícil dizer qual cladóceros é mais sensível a vinhaça (Tabela 7), além disso, por ser uma mistura complexa, sua composição e concentração de substâncias pode variar muito, sendo improvável duas vinhaças exatamente com as mesmas concentrações dos compostos presentes na mistura. Mesmo assim, é perceptível através dos valores encontrados na literatura que este é um composto altamente tóxico para cladóceros quanto está *in natura*, sendo assim, a remediação antes do uso ou descarte é um processo mitigatório necessário.

**Figura 18.** Curva da porcentagem de sobrevivência de *C. silvestrii* em função das concentrações testadas. (A) DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D) (B) Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e (C) Vinhaça. Os pontos destacados fora da curva apontam os valores de CE<sub>10</sub>, 20 e 50.



**Tabela 7.** Valores de toxicidade aguda da vinhaça para cladóceros

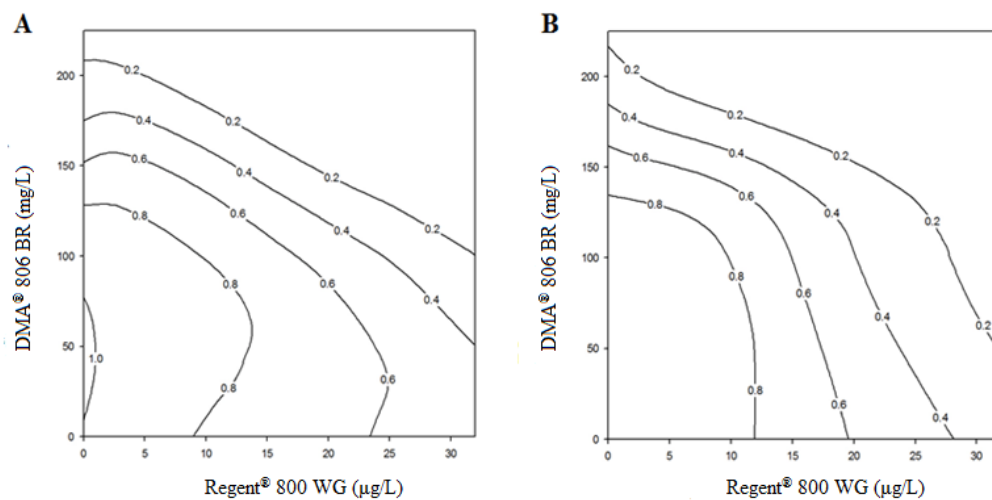
	CE/CL50 (%)				
	<i>D. magna</i>	<i>D. pulex</i>	<i>D. similis</i>	<i>C. dubia</i>	<i>C. silvestrii</i> 0,46 (0,44 – 0,48 %)
<b>Presente trabalho</b>					
Velasqués-Riaño et al. (2019)	4,7				
Paz-Pino et al. (2014)		3,96			
Campos et al. (2014)			0,36		
Barba Ho & García (2012)		5,5			
Botelho et al. (2012)	0,8			0,67	
Ferreira et al. (2011)	3,6		2,2		

\*Os trabalhos citados não apresentaram limite de confiança 95 %

Nos testes agudos de mistura, na primeira etapa (somente com os agrotóxicos) avaliada através de MIXTOX, os dados gerados se ajustaram aos modelos ação independente (IA) e adição de concentração (CA). O modelo que melhor descreveu os efeitos observados para as concentrações testadas foi o modelo CA, que produziu uma soma de resíduos quadrados (SS) de 75,40 ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,80$ ). O desvio dependente do nível de dose (DL) diminuiu o valor de SS para 50,91, sendo estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,87$ ). Em relação ao modelo de ação independente (IA), obteve-se uma soma de SS de 64,20 ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,83$ ). O desvio dependente do nível de dose (DL) diminuiu o valor de SS para 50,85 ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,87$ ). A

interação das concentrações demonstrou antagonismo em baixas doses e sinergismo em altas, e a mudança de antagonismo para sinergismo ocorreu em doses superiores aos valores da  $CE_{50}$ -48h (Figura 18). Como os dois modelos descreveram a toxicidade da mistura, escolheu-se CA como o melhor modelo descritivo, devido à maior significância estatística em DL (Tabela 8). Todos os parâmetros e resultados dos testes de significância obtidos pelo ajuste da ferramenta MIXTOX são mostrados na Tabela 8.

**Figura 19.** Isoblograma dos efeitos da mistura de agrotóxicos na imobilidade de *C. silvestrii*. (A) dependente do nível de dose (DL) do modelo de adição de concentração (CA) e (B) dependente do nível de dose (DL) do modelo de ação independente (IA)



**Tabela 8.** Parâmetros e ajustes dos modelos de referência CA e IA aplicados ao teste agudo de *C. silvestrii* exposta por 48 horas a mistura de DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D) e Regent® 800 WG (i.a. fipronil)

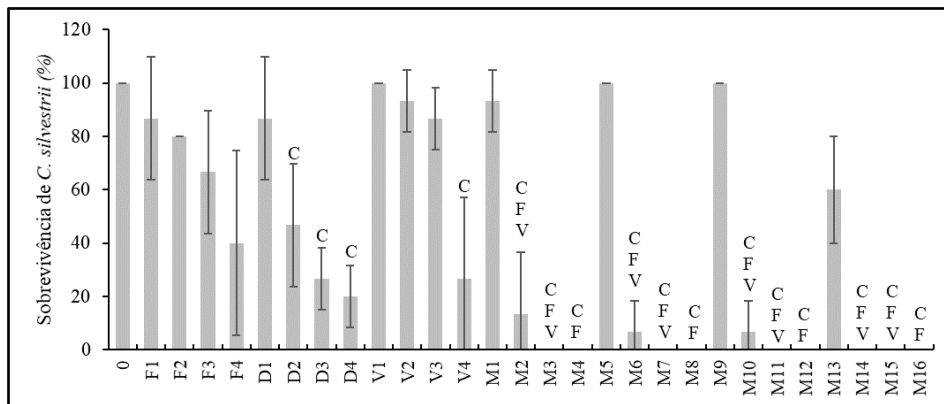
	Adição de concentração				Ação independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
Max	0,85	0,85	0,85	<b>0,98</b>	0,95	0,92	0,92	0,92
$\beta$ DMA	10,49	8,90	8,72	<b>5,84</b>	7,02	8,03	8,02	5,43
$\beta$ Regent	3,59	7,78	8,99	<b>1,09</b>	2,75	3,17	3,12	2,11
$CE_{50}$ DMA® (mg/L)	187,50	176,86	178,73	<b>163,13</b>	162,51	174,14	173,55	172,02
$CE_{50}$ Regent® (µg/L)	41,36	31,53	31,32	<b>32,96</b>	17,38	22,35	22,66	22,78
a	-	0,88	0,65	<b>8,19</b>	-	-2,19	-1,91	3,51
bDR/DL	-	-	0,63	<b>0,72</b>	-	-	-0,67	2,78
SS	75,40	65,05	64,75	<b>50,91</b>	64,20	59,65	59,63	50,85
$r^2$	0,80	0,83	0,83	<b>0,87</b>	0,83	0,84	0,84	0,87

$\chi^2$ ou teste F	308,01	10,34	10,65	<b>14,14</b>	319,20	4,55	0,015	8,79
df	-	1,00	1,00	<b>1,00</b>	-	1,00	1,00	1,00
$p$ ( $\chi^2$ /F)	$2,03 \times 10^{-65}$	0,0012	0,5805	<b>0,0001</b>	$7,78 \times 10^{-68}$	0,0328	0,9008	0,0030

Max é o valor máximo de resposta;  $\beta$  é a inclinação da curva de resposta à dose individual;  $CE_{50}$  é a concentração mediana do efeito; a, bDR e bDL são parâmetros da função; SS é a soma dos resíduos quadráticos;  $r^2$  é o coeficiente de regressão; teste  $\chi^2$  ou F é a estatística do teste; df é o grau de liberdade; e  $p$  ( $\chi^2$ /F) é o nível de significância da estatística do teste. CA é um modelo de adição de concentração e IA é um modelo de ação independente, S/A é um desvio de sinergismo ou antagonismo, DR é um desvio dependente da razão da dose e DL é um desvio no nível da dose.

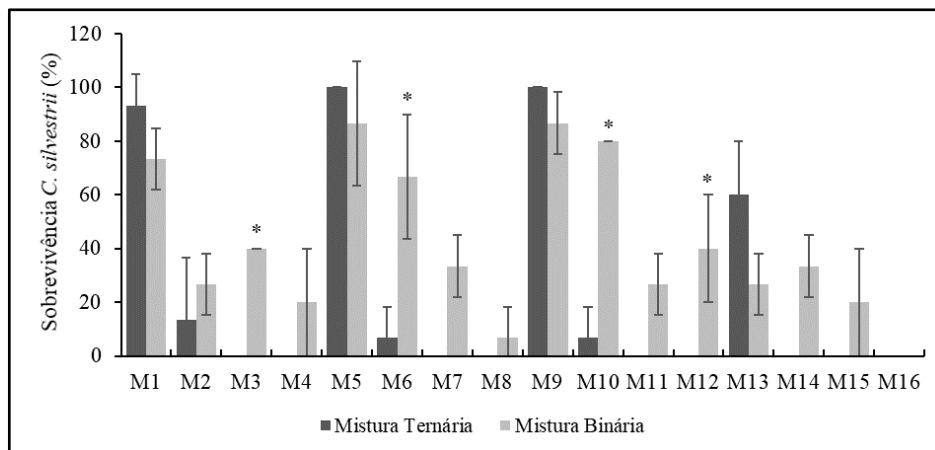
Na segunda etapa da mistura, primeiro foi realizada a análise estatística dos dados em relação as suas referências dos compostos isolados, sendo assim, cada mistura foi comparada com as três concentrações da qual foi composta. As misturas desta etapa foram divididas em quatro blocos, sendo que em cada bloco era mantida a concentração de fipronil com quatro concentrações que combinavam a primeira de herbicida e vinhaça, a segunda de herbicida e vinhaça, a terceira de herbicida e vinhaça e a quarta de herbicida e vinhaça. Apenas quatro das dezesseis misturas não tiveram diferenças significativas. Essas, se referiam as menores concentrações do herbicida e da vinhaça avaliadas com as quatro concentrações de fipronil (ANOVA;  $F = 24,11$ ; Método de Tukey  $p < 0,05$ ). No caso das outras misturas, todas seguiram o mesmo padrão, sendo que as concentrações dois (F's com D2 e V2) e três (F's com D3 e V3) de cada bloco foram significativamente mais tóxicas que suas referências isoladas de fipronil e vinhaça, demonstrando que a mistura teve um efeito sinérgico na sobrevivência de *C. silvestrii*. O último bloco que continha as concentrações de fipronil combinadas com D4 e V4 foram todas significativamente mais tóxicas que suas referências de fipronil isoladas, reforçando que a mistura dos três é mais tóxica que as substâncias isoladas. A Figura 19 resume os resultados obtidos nesta avaliação.

**Figura 20.** Porcentagem de sobrevivência de *C. silvestrii* no teste agudo de misturas ternárias. As letras em cima da barra dos tratamentos representam a diferença significativa do tratamento com relação ao tratamento isolado do controle (C), Regent® (F) e Vinhaça (V)



Em segundo lugar, foi realizada a análise estatística comparando os dois testes de mistura realizados, ou seja, misturas ternárias e binárias, para avaliar o quanto a vinhaça influenciou a toxicidade da mistura. Para isso, as concentrações de agrotóxicos da mistura binária foram analisadas comparando-as com as mesmas quando acrescentado vinhaça no teste 2. A análise estatística mostrou diferenças significativas em apenas quatro das dezesseis combinações analisadas (ANOVA;  $F = 25,2$ ; Método de Tukey  $p < 0,05$ ), onde a vinhaça aumentou consideravelmente a toxicidade da mistura. Ainda, observando qualitativamente o gráfico abaixo (Figura 21), é evidenciado que a sobrevivência nas diferentes concentrações da mistura é majoritariamente maior na mistura binária que na ternária; reafirmando que a vinhaça apresenta ação aditiva ou sinérgica na mistura dos agrotóxicos.

**Figura 21.** Gráfico comparativo de sobrevivência de *C. silvestrii* nos testes de toxicidade de misturas ternárias e binárias. Os asteriscos (\*) representam diferença significativa entre elas.



Na literatura, até o momento não foram encontrados estudos que avaliaram a toxicidade da mistura de 2,4-D e fipronil para cladóceros. No entanto, alguns trabalhos avaliaram a toxicidade de um deles com outros agrotóxicos (ORUC; SEVGILER; UNER, 2004; TAILLEBOIS; THANY, 2016; CARVALHO et al., 2019; LEVCHENKO; SILIVANOVA, 2019). Por exemplo, no caso do fipronil, Lizotte et al. (2009) avaliaram a toxicidade para crustáceos de uma mistura ternária com fipronil e dois herbicidas (atrazina e metacoloro) e concluíram que o inseticida foi o responsável pelo maior efeito tóxico na mistura para o anfípoda *Hyalella azteca*. Este resultado também corrobora com nossos resultados, onde o inseticida foi muito mais tóxico que 2,4-D em todos os *endpoints* avaliados.

No estudo realizado por Key et al. (2007), os autores avaliaram a toxicidade da mistura de fipronil com o herbicida atrazina e o inseticida imidacloprido para larvas do camarão marinho *Palaemonetes pugio*. A mistura com o herbicida teve efeito tóxico um pouco menor do que o fipronil isolado, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente diferente. Na mistura com o outro inseticida os valores de CL<sub>50</sub> também foram menores, reduzindo mais ainda quando foi adicionado o herbicida à mistura binária. Estes resultados também corroboram com os experimentos do presente trabalho onde ocorreu antagonismo em baixas doses. Sabe-se que 2,4-D pode aumentar o metabolismo e os mecanismos antioxidantes de vertebrados na mistura com inseticidas (ORUC; SEVGILER; UNER, 2004), sendo assim, acredita-se que para invertebrados como *C. silvestrii*, algum mecanismo de desintoxicação pode ser reforçado na exposição da mistura. Outro fator que ocorre com vertebrados pode ser uma explicação para o sinergismo em altas doses. O herbicida 2,4-D tem potencial para inibir a acetilcolinesterase em peixes (FONSECA et al., 2008), fato que pode potencializar os efeitos neurotóxicos de fipronil.

No caso do 2,4-D, uma avaliação em mesocosmos em uma mistura com mais quatro herbicidas, aumentou a abundância do gênero *Ceriodaphnia*, enquanto no mesmo estudo quando a mistura foi entre herbicidas e inseticidas ou somente inseticidas, o gênero foi extinto, resultado que reafirma a sensibilidade das espécies de *Ceriodaphnia* para inseticidas (Relyea, 2009). Não foram encontrados outros trabalhos de 2,4-D em mistura para crustáceos, isso provavelmente se dá pelo fato que a sensibilidade destes organismos para o composto tem efeito agudo baixo, com valores de CE e CL<sub>50</sub> em mg/L. Sendo assim, cladóceros podem não ser uma boa escolha para avaliações de impacto ambiental deste herbicida devido as altas concentrações de efeito agudo. Mesmo assim, deve-se salientar que não são apenas os efeitos agudos que devem ser considerados importantes na avaliação de um produto. E essa é uma das lacunas atuais não somente para 2,4-D, mas de muitos outros agrotóxicos largamente consumidos em todo o mundo.



A respeito da análise realizada em MIXTOX, como em nosso estudo, em outras avaliações de toxicidade de mistura os efeitos também foram melhor interpretados por CA (GAZONATO NETO et al., 2019), mesmo para compostos de mistura com diferentes mecanismos de ação (BARATA et al., 2012). No caso de herbicidas, por exemplo, que possuem um mecanismo de ação para as células vegetais, é difícil definir ação direta no nível molecular para outros seres vivos, porque existem vários mecanismos diretos e indiretos que podem ser ativados após a exposição (BUKOWSKA, 2006). Neurotoxicidade, genotoxicidade, histopatologia, dano bioquímico e ruptura endócrina (MARTINEZ-TABCHE; MADRIGAL-BUJAJIDAR; NEGRETE, 2004; XIE et al., 2005; LAJMANOVICH et al., 2013; MENEZES et al., 2015; BENLI et al., 2016) são exemplos de efeitos de 2,4-D encontrados em organismos aquáticos. Além disso, modos de ação secundários podem interferir na resposta dos organismos, como respostas metabólicas, cinética de absorção, compartimentação e excreção das substâncias (BORGERT, 2004; BORGERT et al., 2004; MCCARTY; BORGERT, 2006). E os modelos preditivos CA e IA não consideram estas influências.

Barata et al. (2012) avaliaram o efeito de misturas simples e ternárias de nove compostos na taxa de crescimento de *C. dubia* e observaram que o modo de ação ecotoxicológico é mais eficaz na predição de efeitos do que o modo de ação da substância. Mesmo IA sendo um modelo comprovadamente mais eficaz em responder a toxicidade de misturas com diferentes modos de ação, existe uma tendência de CA ser o modelo mais preditivo na maioria dos estudos com dafnídeos (CEDERGREEN et al., 2008).

Com relação aos parâmetros de qualidade da água, para as avaliações com o agrotóxico isolado Regent<sup>®</sup> os valores de pH ficaram entre 7,47 e 7,82, entre 6,80 e 7,28 mg/L para OD e entre 106,6 e 163,2  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para condutividade. Para DMA<sup>®</sup>, os valores foram: pH 7,34 a 7,79, OD 7,05 a 7,41 mg/L e condutividade entre 156,0 e 237  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Na mistura, os valores de pH, OD e condutividade ficaram entre 7,38 e 7,77, 6,85 e 7,67 mg/L e 156,9 e 239  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . A dureza de todos os testes ficou entre 42 e 48 mgCaCO<sub>3</sub>/L. O que mais diferiu entre os testes foi a condutividade na presença de DMA<sup>®</sup> pela própria formulação do agrotóxico, que contém sal de dimetilamina do 2,4-D (IUPAC dimethylammonium (2,4-dichlorophenoxy) acetate), sendo assim, quanto maior o volume utilizado do produto maior foi a condutividade. No caso dos experimentos com vinhaça, todos os parâmetros tiveram diferenças maiores devido à complexidade da composição da vinhaça. Nos testes agudos somente com a vinhaça, os valores de pH, OD e condutividade ficaram entre 4,52 e 7,60, 4,08 e 7,82 mg/L e 157,8 e 298  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , respectivamente. Na mistura ternária, pH esteve entre 5,08 e 7,56, OD 6,25 a 7,60 mg/L e condutividade entre 157,0 a 304  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . A dureza não foi avaliada nestes testes, mas acredita-

se que ela tenha seguido o padrão da condutividade pela variedade de substâncias contidas na vinhaça (Tabela 5).

### 6.3.2. Testes crônicos em laboratório: produtos isolados e em mistura

Os testes de toxicidade crônica dos agrotóxicos isoladamente mostraram uma  $CE_{50}$ -Reprodução de  $55 \pm 1,8$  mg i.a./L (IC 95 % 51,47-58,73 mg i.a./L) para DMA<sup>®</sup> e de  $1,6 \pm 0,23$   $\mu$ g i.a./L (IC 95 % 1,1-2,1  $\mu$ g i.a./L) para Regent<sup>®</sup>. Os valores calculados de  $CE_{10}$  e  $CE_{20}$  foram de 43 e 47 mg i.a./L para herbicida e 0,22 e 0,45  $\mu$ g i.a./L para inseticida. CENO e CEO foram de 50 e 60 mg i.a./L para o herbicida e 0,4 e 0,8  $\mu$ g i.a./L para o inseticida. Para a vinhaça, não foi possível calcular os valores de  $CE_{50}$ , 20 e 10 para reprodução, pois a produção de neonatas não foi diretamente proporcional como aconteceu com os agrotóxicos, ou seja, quanto maior a concentração menor o número de neonatas. Para ela, das cinco concentrações avaliadas, quatro apresentaram aumento estatisticamente significativo na produção de descendentes. Na última concentração de vinhaça, a reprodução foi afetada com as fêmeas produzindo  $9 \pm 3$  recém-nascidos (média  $\pm$  DP), enquanto o controle produziu  $15 \pm 1$  (média  $\pm$  DP) (ANOVA;  $F = 54,168$ ; Método de Dunnett's  $p < 0,05$ ; Figura 22A). A Figura 23 mostra a média de neonatas das concentrações testadas dos três produtos. Para o inseticida, o número de neonatas diminuiu gradualmente, com pelo menos uma ninhada a menos nas três primeiras concentrações e duas nas duas últimas (Kruskal-Wallis;  $H_5 = 43,66$   $p < 0,05$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ; Figura 22B) enquanto para o herbicida, a reprodução diminuiu significativamente com 60 mg i.a./L ( $7 \pm 5,83$  recém-nascidos) em relação ao controle ( $20 \pm 2,82$  recém-nascidos). Nesta concentração e na maior (70 e 80 mg i.a./L), as fêmeas praticamente não se reproduziram (Kruskal-Wallis;  $H_5 = 41,27$   $p < 0,05$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ; Figura 22C), mantendo ovos inviáveis durante a exposição (Figura 22). A inviabilidade dos ovos é confirmada no tópico 6.2.6, onde mesmo após um ciclo que seria de pelo menos três ninhadas (Jaconetti, 2005), ovos como estes não geraram neonatas. Um resumo dos valores obtidos nos testes de toxicidade aguda e crônica dos produtos isolados é apresentada na Tabela 9.

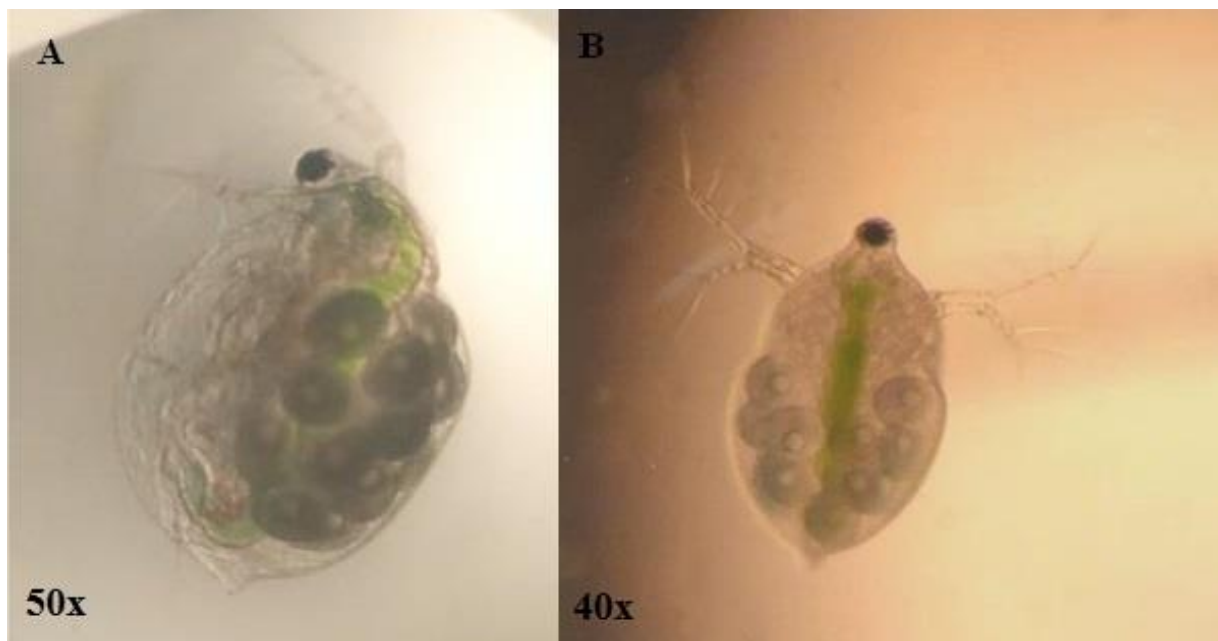
**Tabela 9.** Valores de CE para *Ceriodaphnia silvestrii* em testes agudos e crônicos da Vinhaça e dos agrotóxicos DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D) e Regent® 800 WG (i.a. fipronil)

Imobilidade	Fipronil (µg i.a./L)		2,4-D (mg i.a./L)		Vinhaça (%)	
	Média ± DP*	CI 95 %**	Média ± DP*	CI 95 %**	Média ± DP*	CI 95 %**
CE <sub>10</sub>	2,1 ± 0,68	0,76 - 3,4	133 ± 15	97 - 163	0,42 ± 0,008	0,38 - 0,46
CE <sub>20</sub>	2,6 ± 0,65	1,3 - 3,6	145 ± 18	111 - 172	0,43 ± 0,004	0,40 - 0,46
CE <sub>50</sub>	3,9 ± 0,50	2,5 - 4,9	169 ± 18	138 - 192	0,46 ± 0,008	0,44 - 0,48
<b>Reprodução</b>						
CE <sub>10</sub>	0,22 ± 0,10	0,01 - 0,42	43 ± 3,2	36 - 49	-	-
CE <sub>20</sub>	0,45 ± 0,14	0,16 - 0,74	47 ± 2,7	41 - 52	-	-
CE <sub>50</sub>	1,6 ± 0,23	1,1 - 2,1	55 ± 1,8	51 - 59	-	-

\* Desvio padrão

\*\* Intervalo de confiança

**Figura 22.** Fêmeas no final do teste crônico. (A) Fêmea do controle após a terceira ninhada. (B) Fêmea com ovos inviáveis (que não se desenvolveram) por exposição ao herbicida DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D).



**Fonte:** Silva et al. (2021)

A comparação dos dados da primeira reprodução mostrou diferenças significativas apenas para a última concentração de DMA® (Kruskal-Wallis;  $H_5 = 19,772$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ; Figura 22D), enquanto não houve nenhuma para Regent® (Kruskal-Wallis;  $H_5 = 8,530$ ;  $p = 0,129$ ; Figura 22E) e Vinhaça (Kruskal-Wallis;  $H_5 = 0$ ;  $p = 1$ ; Figura 22F).

Em relação à taxa intrínseca de aumento populacional ( $r$ ), a análise estatística mostrou uma redução na taxa de 41 % em 60 mg/L e 100 % nas duas últimas concentrações para o herbicida (Kruskal-Wallis;  $H_5 = 55,790$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ; Figura 22G). No caso do inseticida, foi observada diferença significativa em todos os tratamentos com redução de 3 a 36 % nos valores de  $r$  ao longo das concentrações (ANOVA One Way;  $F_5 = 944,682$ ;  $p < 0,05$ ; teste de Dunnett,  $p < 0,05$ ; Figura 22H). Já para a vinhaça, assim como na reprodução, os valores de  $r$  foram maiores que os valores obtidos no controle, com diferenças estatisticamente significativas em 0,05; 0,1 e 0,15 % (Kruskal-Wallis;  $H_5 = 42,938$ ; Método de Dunn  $p < 0,001$ ; Figura 22I). Ao longo das concentrações houve um aumento de no mínimo 3 % e no máximo 48 % nos valores de  $r$ .

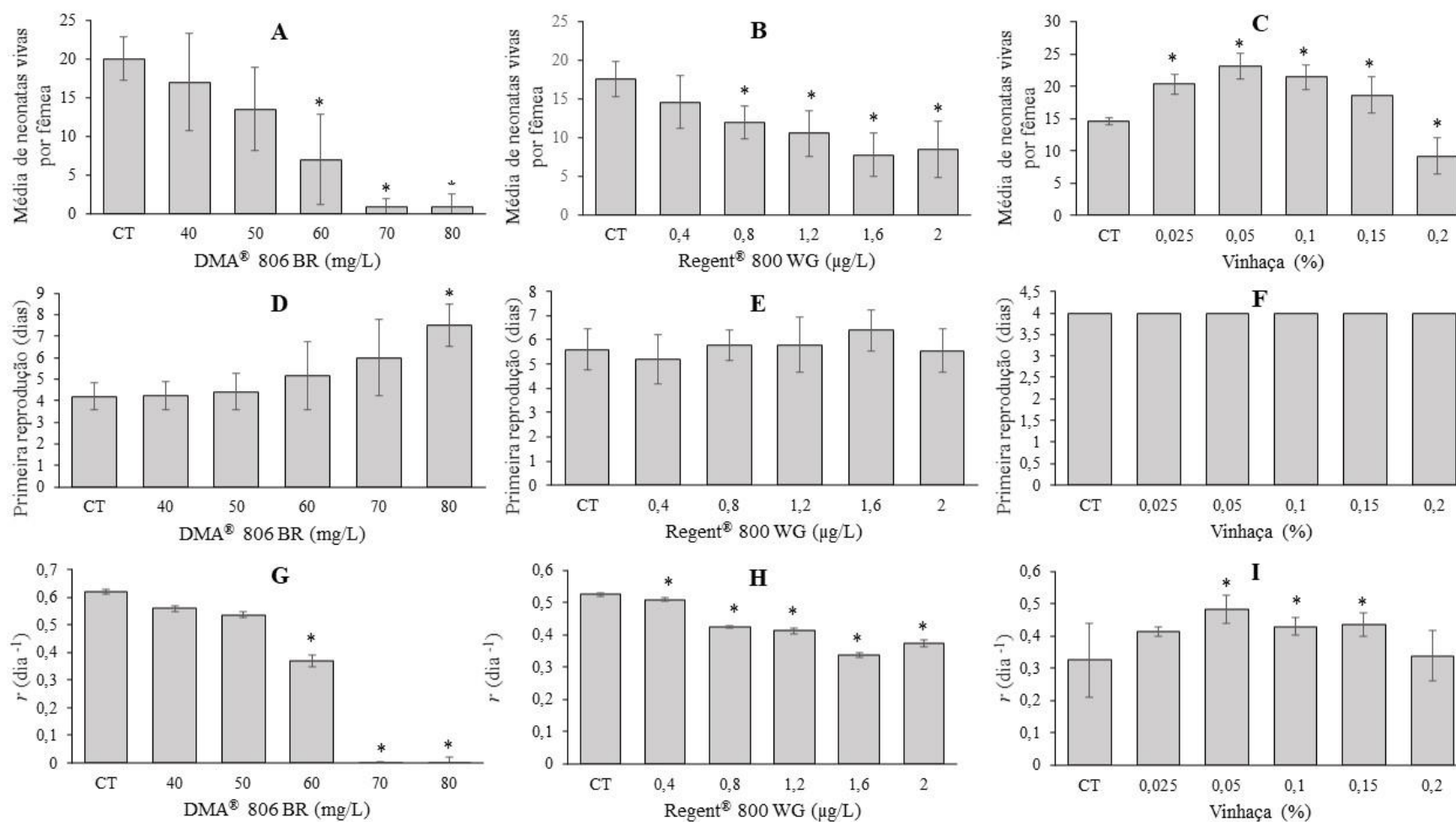
Com relação aos agrotóxicos, outros inseticidas como clorpirifós, ciflutrina, cipermetrina, endosulfan, etofenprox e lindano demonstraram alterar a idade da primeira ninhada e a taxa intrínseca de aumento da população de *Daphnia* quando comparada a tratamentos não contaminados (FERNÁNDEZ-CASALDERREY; FERRANDO; ANDREU-MOLINER, 1993; FERRANDO; SANCHO; ANDREU-MOLINER, 1995; BRAUSCH; SALICE, 2011; RAJINI; REVATHY; CHITRIKHA, 2016; SANCHO et al., 2018).

No caso do diurom, molinato e propanil, alguns autores também verificaram que esses herbicidas alteraram as duas taxas avaliadas (primeira ninhada e  $r$ ) para *Daphnia* (SÁNCHEZ; ANDREU-MOLINER; FERRANDO, 2004; PEREIRA; MENDES; GONÇALVES, 2007; BRAUSCH; SALICE, 2011). No entanto, para diurom, o estudo realizado com *D. magna* mostrou que os efeitos tóxicos foram mitigados ao longo das gerações (BRAUSCH; SALICE, 2011). Atrasos na primeira ninhada podem afetar diretamente os valores de  $r$ , interferindo diretamente na velocidade com que a população se expande no ecossistema (ALLAN, 1976). No presente estudo, *C. silvestrii*, apesar de sobreviver nas maiores concentrações de DMA<sup>®</sup>, teve sua reprodução comprometida. No sistema aquático, esse período sem reprodução pode ser suficiente para contribuir para o desaparecimento das espécies no habitat, já que existe a questão da predação e redução da capacidade competitiva com uma população menor. É claro que não se pode esquecer que uma ausência na reprodução pode ser um investimento em ganho de massa ou outro mecanismo que colabora para a espécie continuar no sistema, no entanto, pode também sinalizar dificuldade na obtenção de alimento que conseqüentemente afeta a reprodução.

No caso do Regent<sup>®</sup>, a diminuição da fertilidade e a taxa intrínseca de aumento da população, associada ao grande potencial tóxico do inseticida em baixas concentrações podem ser um fator importante no rápido desaparecimento de *C. silvestrii* em áreas contaminadas. No

caso da vinhaça, apesar de não ocorrerem efeitos negativos significativos na espécie nas concentrações testadas, deve-se atentar que a porcentagem de vinhaça que favorece a reprodução e eleva a taxa  $r$  está dentro de uma faixa restrita de valores, e pode ser que esse favorecimento seja um mecanismo protetivo para a espécie, sendo assim, não pode-se afirmar que esta faixa é segura para a espécie.

**Figura 23.** Dados de reprodução, primeira ninhada e taxa intrínseca de aumento populacional (número médio  $\pm$  desvio padrão) de *C. silvestrii* após exposição isolada de 8 dias a diferentes concentrações dos agrotóxicos DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D), Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e à vinhaça da cana-de-açúcar. O asterisco indica o valor significativamente diferente do controle ( $p \leq 0,05$ ).



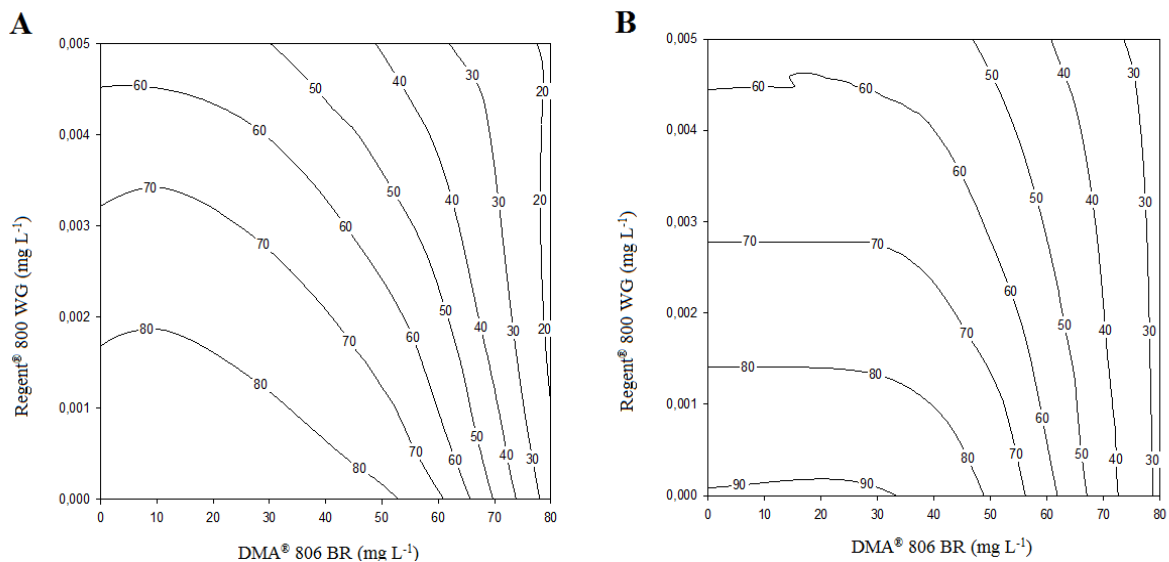
Com respeito as informações disponíveis na literatura sobre as substâncias avaliadas, para o 2,4-D, apesar de esse composto ser uma molécula relativamente antiga no mercado e os cladóceros serem amplamente utilizados em testes de toxicidade, não foram encontrados muitos estudos avaliando a toxicidade crônica. Para *D. magna*, duas referências apontam para valores de CEO para a espécie com uma diferença de 15 vezes. US EPA (1992) apresentou valores de CENO e CEO de 79 e 151 mg/L, enquanto Matsumoto et al. (2009) obtiveram um CEO de 10 mg/L. Para *C. dubia*, os valores de  $CI_{50}$  (concentração inibidora da reprodução de 50 %) obtidos por Oris et al. (1991) foi entre 86,8 mg/L (4 dias) e 69,8 mg/L (7 dias), valores aos quais, no presente estudo, *C. silvestrii* reduziu drasticamente a reprodução. No caso dessa redução, supõe-se que as concentrações sejam estressantes de tal modo que *C. silvestrii* focou sua energia (trade-off) apenas na sobrevivência. Gottardi et al. (2017) observaram que *D. magna* exposta ao fungicida epoxiconazol inicialmente alocou sua energia para crescimento e reprodução, sugerindo um trade-off com comprometimentos subsequentes nas respostas imunes e mobilidade. No caso de *C. silvestrii*, não foram avaliados outros parâmetros subletais, como comprimento do organismo, atividade enzimática ou comportamento de natação, que colaboram para afirmar a adequação dos resultados obtidos com a alocação de energia (FORBES, 2000). No entanto, a inibição da reprodução sem nenhum efeito agudo em fêmeas expostas ao 2,4-D demonstra um alto esforço metabólico e fisiológico do organismo para sobreviver às concentrações testadas do herbicida. Além disso, comparando os resultados do presente estudo com os apresentados para *C. dubia* por Oris et al. (1991), observa-se que a espécie é aparentemente mais sensível ao 2,4-D do que seus parentes do mesmo gênero.

Para fipronil, as concentrações subletais testadas no teste crônico estão próximas das concentrações testadas no teste de toxicidade aguda, demonstrando assim a alta toxicidade do composto para *C. silvestrii*. Outras espécies de cladóceros têm efeitos em seus parâmetros de vida em concentrações de fipronil até 110 vezes maior. Por exemplo, para *D. pulex* exposta ao produto formulado Regent<sup>®</sup> 4 SC, em um experimento de 10 dias, os valores de CENO e CEO foram de 30 e 50 µg/L, com extinção da espécie na concentração de 80 µg/L (STARK; VARGAS, 2005). No caso de *D. magna*, os dados de desenvolvimento e sobrevivência têm valores de CEO de 19 e 27 µg/L, com CENO de 9,6 µg/L (US EPA 1992). Para a parente de *C. silvestrii* de clima temperado, *C. dubia*, Wilson et al. (2008) avaliaram os efeitos subletais na mobilidade, desenvolvimento e reprodução do fipronil e de seus enantiômeros. O valor de CEO para a reprodução do racemato foi de 15 µg/L, 19 vezes mais que o CEO de *C. silvestrii*. Os enantiômeros S - (+) e R - (-) apresentaram valores de CEO de 2 e 30 µg/L.

No caso da vinhaça, não foram encontrados dados sobre toxicidade crônica e/ou outros efeitos subletais para cladóceros, sendo que outros dados disponíveis na literatura avaliam a toxicidade em plantas e peixes, referências citadas nos Capítulos I e III deste trabalho.

Para os testes crônicos de mistura, na primeira etapa (somente com os agrotóxicos) avaliada através de MIXTOX, os dados obtidos se ajustaram aos modelos IA e CA. O modelo que melhor descreveu os efeitos na reprodução de *C. silvestrii* foi também a adição de concentração (CA), que resultou em uma soma de resíduos quadrados (SS) de 2771,85 ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,69$ ). Após adicionar o parâmetro "a" ao modelo para descrever o desvio S/A, o valor de SS diminuiu para 2438,4 e foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,73$ ) mostrando antagonismo como resultado da interação das concentrações dos agrotóxicos (Figura 24). O desvio dependente da razão da dose (DR) e o desvio dependente do nível da dose (DL) não foram significativos ( $p = 0,09$  e  $0,10$ ). No caso de IA, a soma dos resíduos foi de 2558,02 ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,72$ ). Após adicionar o parâmetro "a" ao modelo para descrever o desvio S/A, o valor de SS diminuiu para 2469,03, mas não foi significativo ( $p > 0,05$ ;  $r^2 = 0,73$ ), bem como para DR e DL ( $p = 0,33$  e  $0,31$ ). Todos os parâmetros e resultados dos testes de significância obtidos pelo ajuste da ferramenta MIXTOX são mostrados na Tabela 10.

**Figura 24.** Isoblograma dos efeitos da mistura de agrotóxicos na reprodução de *C. silvestrii*. (A) antagonismo do modelo de adição de concentração (CA) e (B) antagonismo do modelo de ação independente (IA)





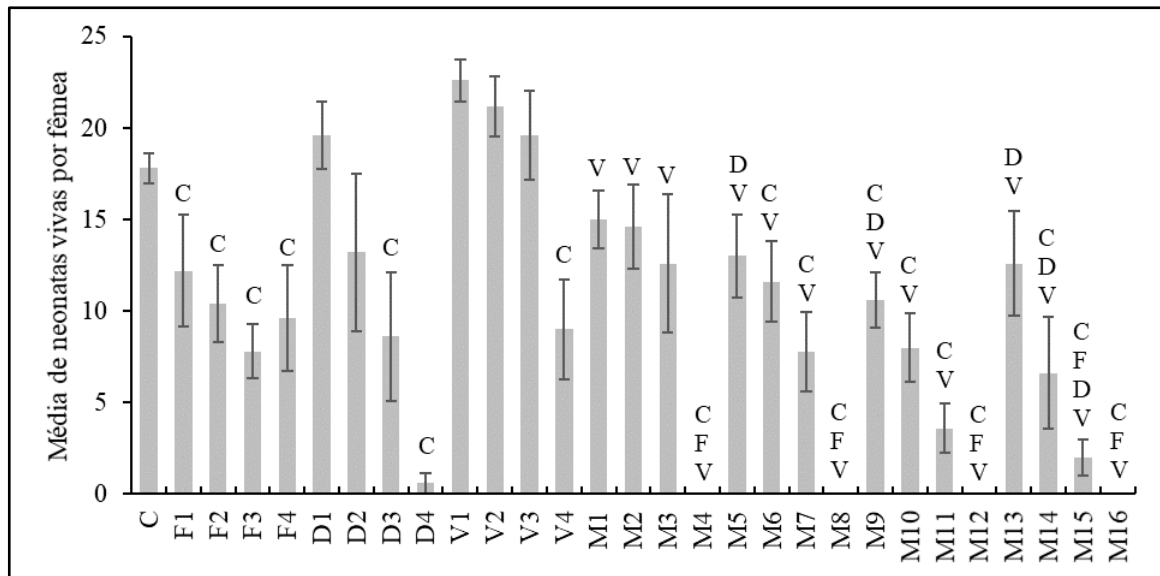
**Tabela 10.** Parâmetros e ajustes dos modelos de referência de CA e IA aplicados ao teste crônico de *C. silvestrii* exposta por 8 dias a mistura de DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D) e Regent® 800 WG (i.a. fipronil)

	Adição de concentração				Ação independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
Max	86,24	<b>84,73</b>	84,15	84,47	90,62	86,28	84,96	87,81
βDMA	9,37	<b>8,89</b>	9,37	9,03	5,71	6,42	7,49	6,34
βRegent	1,14	<b>1,96</b>	2,16	2,21	1,17	2,05	2,47	1,12
CE <sub>50</sub> DMA® (mg/L)	72,88	<b>72,66</b>	73,01	72,68	69,58	71,01	71,84	70,85
CE <sub>50</sub> Regent® (mg/L)	0,015	<b>0,007</b>	0,006	0,007	0,008	0,007	0,006	0,010
a	-	<b>1,16</b>	2,22	0,65	-	-1,21	1,46	1,37
bDR/DL	-	-	-1,70	-0,71	-	-	-5,60	5,70
SS	2771,85	<b>2438,41</b>	2404,16	2434,30	2558,02	2469,03	2331,3	2395,42
r <sup>2</sup>	0,69	<b>0,73</b>	0,73	0,87	0,72	0,73	0,74	0,74
χ <sup>2</sup> ou teste F	16,53	<b>4,35</b>	4,83	4,41	18,52	1,20	3,15	2,23
df	-	<b>1,00</b>	1,00	1,00	-	1,00	1,00	1,00
p (χ <sup>2</sup> / F)	3,65 x 10 <sup>-7</sup>	<b>0,03</b>	0,09	0,10	1,17 x 10 <sup>-7</sup>	0,27	0,33	0,31

Max é o valor máximo de resposta; β é a inclinação da curva de resposta à dose individual; CE<sub>50</sub> é a concentração mediana do efeito; a, bDR e bDL são parâmetros da função; SS é a soma dos resíduos quadráticos; r<sup>2</sup> é o coeficiente de regressão; teste χ<sup>2</sup> ou F é a estatística do teste; df é o grau de liberdade; e p (χ<sup>2</sup> / F) é o nível de significância da estatística do teste. CA é um modelo de adição de concentração e IA é um modelo de ação independente, S/A é um desvio de sinergismo ou antagonismo, DR é um desvio dependente da razão da dose e DL é um desvio no nível da dose.

Para a segunda etapa das misturas crônicas, assim como nos testes agudos, foi realizada a análise estatística das misturas comparando-as com as concentrações isoladas das quais elas foram compostas. Além disso, elas também foram divididas em quatro blocos, sendo que em cada bloco era mantida a concentração de fipronil com quatro concentrações que combinavam a primeira de 2,4-D e vinhaça, a segunda de 2,4-D e vinhaça, a terceira de 2,4-D e vinhaça e a quarta de 2,4-D e vinhaça. Todas as concentrações da mistura foram significativamente diferentes (mais tóxicas) a pelo menos um tratamento do qual estavam relacionadas (ANOVA; F = 45,98; Método de Tukey p < 0,05; Figura 24). Todos os tratamentos foram diferentes estatisticamente das concentrações isoladas da vinhaça demonstrando que a presença dos agrotóxicos pode anular a maior média de neonatas das menores concentrações de vinhaça como ocorreu nos testes crônicos isolados e nos isolados da mistura ternária.

**Figura 25.** Média de neonatas por fêmea de *C. silvestrii* durante teste crônico de misturas ternárias. As letras em cima da barra dos tratamentos representam a diferença significativa do tratamento com relação ao tratamento isolado do controle (C), Regent® (F), DMA® (D) e Vinhaça (V)



A respeito dos estudos crônicos de toxicidade da mistura, assim como comentado no tópico dos testes agudos, até o momento não foram encontrados estudos com a mistura de 2,4-D e fipronil e existem somente alguns estudos onde estes ativos são testados com outros compostos. No caso dos estudos citados anteriormente, nenhum deles foi realizado com a metodologia e os *endpoints* aplicados neste trabalho. Sendo assim, não há possibilidade de fazer algum tipo de comparação, onde um dos compostos esteve presente na avaliação. O mesmo acontece com a mistura com a vinhaça. No caso do teste binário, o principal resultado foi o antagonismo, resultado já esperado em decorrência dos resultados obtidos nos testes agudos onde ocorreu antagonismo em baixas doses. Este resultado confirma a necessidade de um estudo metabólico para compreender os mecanismos deste efeito de 2,4-D na toxicidade de fipronil para *C. silvestrii*.

Para a mistura ternária, pode-se perceber que os agrotóxicos foram responsáveis pelos efeitos aditivos da toxicidade da mistura, já que as fêmeas nas concentrações isoladas da vinhaça tiveram uma média reprodutiva acima do mínimo estipulado para a espécie (15 neonatas; JACONETTI, P. C. M., 2005) em três das quatro concentrações. Estes resultados diferem dos testes agudos onde a presença da vinhaça foi responsável por maior toxicidade. Isso demonstra que, como ela é uma fonte de micronutrientes para os animais, só interfere na sobrevivência dos organismos em doses mais próximas dos efeitos agudos. No entanto, deve-se lembrar que a diferença entre a dose de efeito letal e subletal é baixa, sendo assim, a

possibilidade de efeitos tóxicos é relativamente alta, ainda mais em conjunto com outras substâncias tóxicas.

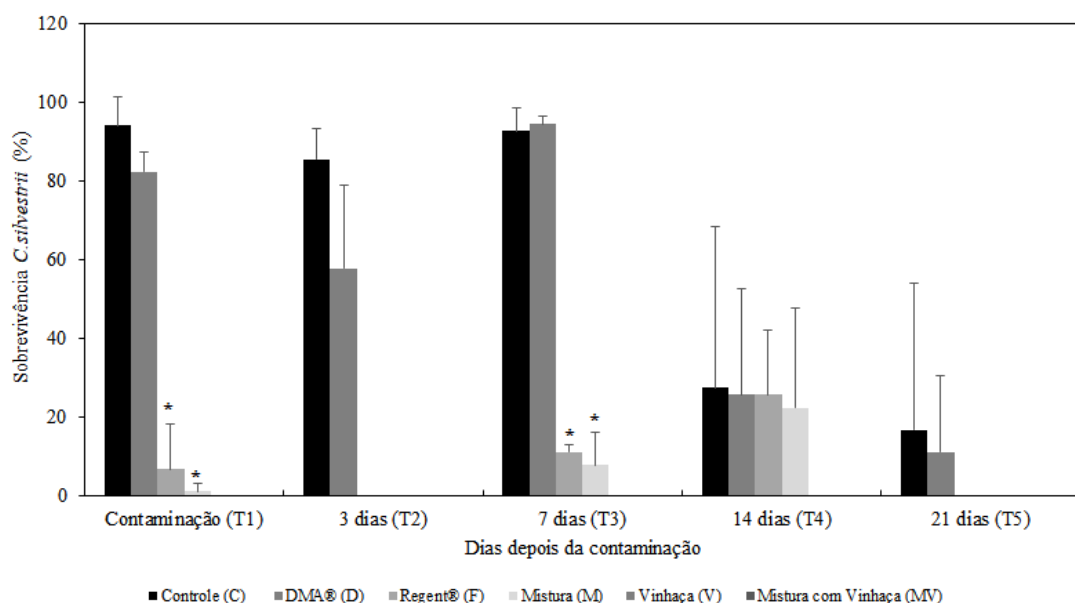
Com relação a outros agrotóxicos, existe uma gama de estudos de mistura avaliando os efeitos em cladóceros (e. g. BAILEY et al., 1997; WOODS; KUMAR; CORRELL, 2002; BANKS et al., 2005). No entanto, a maior parte deles concentra-se em avaliações de toxicidade aguda, que podem limitar os resultados obtidos e até mascarar sinergismo entre substâncias (BJERGAGER et al., 2017). Poucos trabalhos abordam a toxicidade de mistura em experimentos com mais de 48 horas, avaliando a reprodução de uma espécie em nível laboratorial (BRAUSCH; SALICE, 2011; PAVLAKI et al., 2011; HASSOLD; BACKHAUS, 2014) ou em campo (LOPES et al., 2011; BJERGAGER et al., 2012). Num cenário em que os agrotóxicos geralmente estão presentes no ambiente em mistura (MARCHESAN et al., 2010; CETESB, 2018), é importante reunir informações suficientes das substâncias mais frequentemente encontradas para a previsão dos efeitos tóxicos para as populações e comunidades presentes do ecossistema. Neste sentido, os estudos de efeitos subletais devem ser prioridade para os próximos anos, visto que antes de provocar a mortalidade dos cladóceros, a mistura de agrotóxicos pode interferir na alimentação (SHAHID; LIESS; KNILLMANN, 2019), comportamento (SCHMIDT; STEINBERG; STAAKS, 2005), abundância (RELYEA, 2009) e reprodução (BRAUSCH; SALICE, 2011) causando danos a fêmea e seus embriões (HASSOLD; BACKHAUS, 2014), além de outros efeitos em níveis moleculares, que ocasionam uma cascata de efeitos diretos e indiretos, como alterações hormonais e bioquímicas como alterações em enzimas e estresse oxidativo (MU; LEBLANC, 2004).

Os valores dos parâmetros físicos e químicos dos testes realizados para Regent<sup>®</sup> isolado foram de 7,42 a 7,68 para pH, de 6,89 a 7,84 mg/L para OD e de 156,6 a 175,8  $\mu$ S/cm para condutividade. Para DMA<sup>®</sup> isolado, pH ficou entre 7,31 e 7,92, OD entre 7,0 e 7,63 mg/L e condutividade entre 163,7 a 208  $\mu$ S/cm. Na mistura, os valores foram de 7,01 a 7,78, 6,60 a 7,95 mg/L e 158 a 219  $\mu$ S/cm, respectivamente. A dureza de todos os testes ficou entre 44 e 48 mgCaCO<sub>3</sub>/L. Para a vinhaça, os valores variaram menos que os testes agudos pelo fato de as concentrações serem menores, ficando entre 7,18 a 7,89 para pH, 6,60 a 7,36 mg/L para OD e 159,5 a 201  $\mu$ S/cm para condutividade. Na mistura ternária o pH variou entre 7,19 e 7,72, o OD entre 6,82 e 7,68 e a condutividade entre 158,4 e 242  $\mu$ S/cm. A dureza nas concentrações do composto não foi medida, apenas da água de cultivo, que estava dentro do estipulado na ABNT (2017). Assim como nos testes agudos, acredita-se que os valores de dureza aumentaram conforme as concentrações testadas, assim como a condutividade.

### 6.3.3. Testes agudos em mesocosmos

Para os testes agudos em mesocosmos realizou-se a análise estatística de apenas três dos cinco testes realizados. Depois de sete dias, houve uma mudança nos níveis de oxigênio dissolvido (Tabela 3) com concentrações inviáveis para a homeostase de *C. silvestrii*. Neste sentido, não foi possível validar os testes de toxicidade em campo a partir desta amostragem, pois o controle apresentou alta mortalidade juntamente com os tratamentos contaminados. Os testes de toxicidade analisados tanto por tratamento (ANOVA *repeated measures*,  $F = 3,31$  Método de Tukey  $p = 0,0018$ ) quanto por mesocosmos (ANOVA *repeated measures*,  $F = 2,17$  Método de Tukey  $p = 0,00088$ ) mostraram alta toxicidade dos tratamentos contaminados com exceção do herbicida (Figura 25).

**Figura 26.** Taxa de sobrevivência de *C. silvestrii* nos testes de toxicidade aguda em mesocosmos ao longo do tempo.



Comparando os resultados obtidos nos testes agudos de laboratório e as concentrações dos contaminantes aplicadas em mesocosmos, esperava-se o padrão de toxicidade visto nos tratamentos contaminados nesta avaliação. A quantificação dos agrotóxicos confirma que as concentrações de fipronil continuam maiores que a  $CE_{50}$  até 21 dias após a contaminação (Tabela 4), resultados que explicam a toxicidade contínua dos tratamentos de Regent®, mistura e mistura com vinhaça, além do fator do OD baixo. No caso da vinhaça, a concentração aplicada (1,3 %) é cerca de três vezes maior que a média da  $CE_{50}$ , juntamente com os níveis elevados de condutividade, turbidez e dureza, que combinados com os níveis de OD, são suficientes para

explicar a ininterrupta toxicidade deste tratamento e da mistura com vinhaça. A alta condutividade e dureza dos mesocosmos com vinhaça pode ser explicada pelas altas concentrações de cálcio, potássio, magnésio e sódio da amostra. Os valores de dureza nos tratamentos sem a vinhaça variaram entre 10 e 34 (mgCaCO<sub>3</sub>/L) enquanto nos tratamentos com vinhaça este valor chegou até 200. Em testes laboratoriais com *C. silvestrii*, os valores ótimos de dureza para a solução-teste estão entre 40-48 mg/L (ABNT, 2017). Apesar de águas mais duras reduzirem a toxicidade de alguns componentes presentes na água (PENTTINEN; KOSTAMO; KUKKONEN, 1998), proporções altas de cálcio e magnésio podem aumentar a sensibilidade de dafinídeos (DAVIES; HALL, 2007) tornando-se a causa primária da toxicidade de efluentes para cladóceros (NORBERG-KING, 2005).

Em geral, a maioria dos parâmetros analisados aumentou após a contaminação em todos os tratamentos, como por exemplo: turbidez, clorofila (exceto em Regent<sup>®</sup>), nitrogênio (exceto em DMA<sup>®</sup>) e fósforo total, fosfato inorgânico, fosfato total dissolvido, nitrato, silicato e amônia (exceto na mistura com vinhaça). Lembrando que a alteração dos parâmetros físicos e químicos dos tratamentos vinhaça e mistura com vinhaça foi muito mais proeminente do que nos outros tratamentos. O excesso de nutrientes e de outras substâncias tóxicas para os dafinídeos, como a amônia, são fatores que desequilibram processos como a fotossíntese e a decomposição (ADAMSSON et al., 1998). A mudança na composição dos mesocosmos após a contaminação, além da própria aplicação dos agrotóxicos e da vinhaça, foram suficientes para provocar danos irreversíveis na população de *C. silvestrii*, como ocorreu com a mortalidade de 100 % nos tratamentos contaminados (exceção do herbicida) e de mais de 80 % em todos os tratamentos a partir de 21 dias. Cladóceros são conhecidos como organismos extremamente sensíveis a alterações na dinâmica do ambiente, sejam elas de origem natural ou antropogênica, por esta razão são os organismos mais indicados como bioindicadores na avaliação de desequilíbrio nos ecossistemas aquáticos (DODSON; HANAZATO, 1995).

#### **6.3.4. Testes agudos, crônicos e populacionais com amostras do mesocosmos**

Com relação aos testes agudos com as amostras dos mesocosmos em laboratório, ao contrário dos testes em campo, nenhum fator foi limitante o suficiente para invalidá-los no meio da amostragem temporal após a contaminação dos tanques. Neste sentido, nove testes agudos foram realizados e validados em contrapartida com três de cinco dos testes em campo. A análise estatística temporal por tratamento (ANOVA *repeated measures*, F = 29,65 Método de Tukey  $p < 0,05$ ) mostrou que não ocorreram diferenças significativas entre os controles com a água

dos controles do mesocosmos, o controle do laboratório (água reconstituída - ASTM) e as amostras dos tanques com o herbicida isolado em toda a amostragem dos mesocosmos (teste 1 ao 9). No caso do tratamento isolado do inseticida e da mistura com DMA<sup>®</sup>, os mesocosmos só se igualaram estatisticamente ao controle com 75 dias após a contaminação. Os tratamentos com vinhaça e mistura de agrotóxicos com a vinhaça foram diferentes significativamente do controle até o final da amostragem dos mesocosmos. Até o quarto teste (7 dias pós-contaminação), todos os tratamentos contaminados (exceto DMA<sup>®</sup>) apresentaram 100 % de mortalidade. Estes resultados são muito bem explicáveis pela concentração de fipronil nos tratamentos que os continham e pela alta toxicidade da porcentagem de vinhaça aplicada para *C. silvestrii* (Tabela 4).

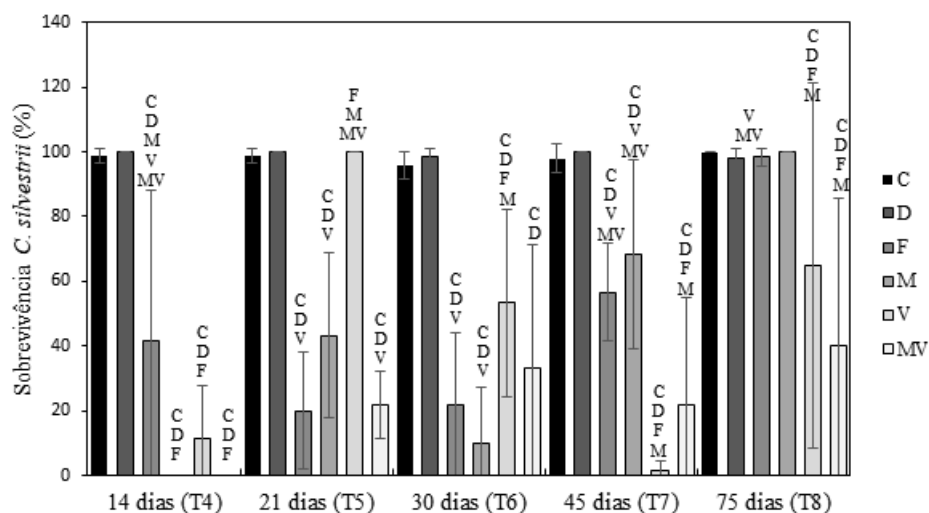
Após isso, os tratamentos oscilaram de forma expressiva (Figura 27) sem nenhum padrão de redução ou aumento da toxicidade. A análise das concentrações dos agrotóxicos nas amostras mostrou que para o tratamento com Regent<sup>®</sup> a média da concentração de fipronil ficou próxima do valor de CE<sub>50</sub> até 21 dias, o que em partes explica a mortalidade. Com 30 dias, a média chega próximo da CE<sub>10</sub>, o que não explica a mortalidade. Comparando os parâmetros químicos e físicos da água das amostras de 21 dias e 30 dias pode-se notar o aumento de sete vezes o nível de fosfato inorgânico, seis vezes a concentração de amônia, três vezes o nitrato e outras formas de fósforo que tiveram como consequência o aumento também do nível de clorofila nas amostras. O aumento de nutrientes com a amônia elevada em ambientes com baixo oxigênio também pode demonstrar o aumento de processos de decomposição realizado por bactérias, fungos e outros organismos (ESTEVEZ, 2011). Outro fator importante entre essas duas coletas foi que a verificação dos dados climatológicos (Tabela 3) mostrou alto índice pluviométrico na semana da coleta de 30 dias. Este fator pode ter provocado um revolvimento de substâncias depositadas no tanque e/ou modificado a biota. Diferenças na composição química e biológica podem ser suficiente para aumentar a sensibilidade dos organismos. A sobrevivência em 45 e 75 dias foi acima de 50 % e a composição dos parâmetros físicos e químicos é próxima. A concentração de fipronil foi 24 vezes menor em 75 dias, fator que explica a ausência de toxicidade dos tanques de Regent<sup>®</sup> ao final da amostragem.

No que diz respeito as concentrações na mistura, até a coleta de 30 dias a média de fipronil ficou próxima do valor de CE<sub>50</sub>, fator que juntamente com as condições físicas e químicas da água responde a mortalidade apresentada. Assim como nos tanques de Regent<sup>®</sup>, a concentração de fipronil cai drasticamente após isso, o que explica a diminuição da toxicidade com 45 e a falta dela com 75 dias.

No caso da vinhaça, a coleta de 45 dias não correspondeu ao padrão de redução de toxicidade ao longo do tempo. Comparando os fatores físicos e químicos desta amostragem com a apresentada em 75 dias pode-se verificar a diminuição de todos os índices avaliados com destaque para os nutrientes em todas as formas de análise de nitrogênio e fósforo. Essas variáveis respondem a diferença da sobrevivência entre as duas coletas. No entanto, a comparação entre 30 e 45 dias não apresenta uma explicação tão clara para a diferença de toxicidade. Em laboratório, a diferença entre elas esteve presente apenas nos níveis iniciais de oxigênio dissolvido, mas que não ultrapassara o limite aceitável para a espécie de 4 mg/L (ABNT, 2017). Neste sentido, aspectos físicos e químicos não respondem as diferenças que proveram provavelmente de diferenças da composição biológica entre elas, já que a vinhaça por sua carga orgânica e química pode envolver uma série de microrganismos na sua depuração (MOTA; ARAÚJO; AMARAL, 2015; VILAR et al., 2018).

No tratamento da mistura dos agrotóxicos com a vinhaça, a concentração de fipronil permaneceu próxima do valor de  $CE_{50}$  até o final da amostragem, isso e a vinhaça são suficientes pra responder sobre o perfil de sobrevivência de *C. silvestrii* neste tratamento.

**Figura 27.** Taxa de sobrevivência de *C. silvestrii* em laboratório com amostras dos mesocosmos a partir de 14 dias após a contaminação. As letras em cima da barra de cada tratamento representam a diferença estatística significativa dele em relação aos outros tratamentos, sendo: C (controle), D (DMA<sup>®</sup>), F (Regent<sup>®</sup>), M (Mistura), V (Vinhaça) e MV (Mistura com vinhaça)

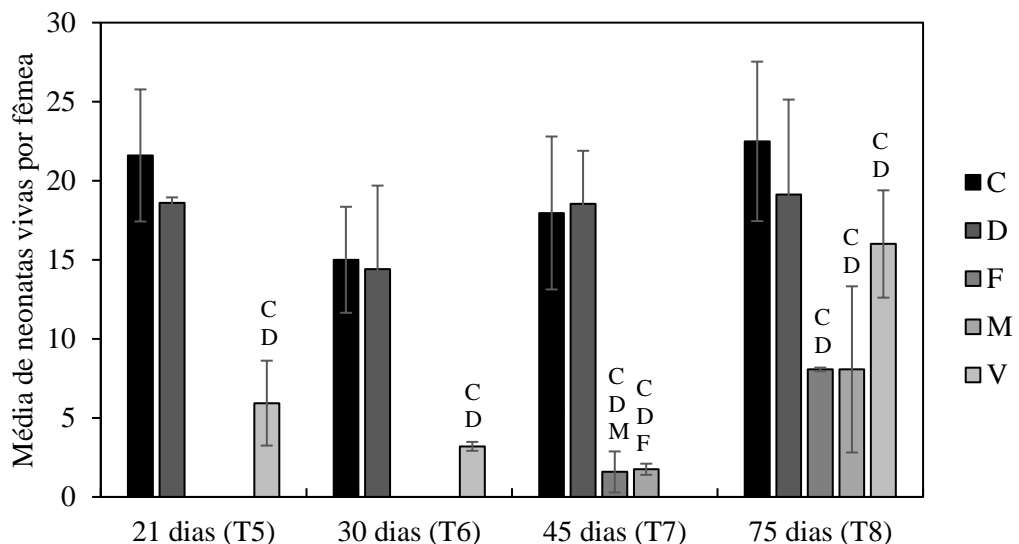


Com relação aos testes crônicos, oito testes foram realizados sendo que nos primeiros quatro testes só haviam os tratamentos de controle e do herbicida (até 14 dias). Até neste ponto, a análise estatística tanto por mesocosmos (ANOVA *repeated measures*,  $F = 5,35$  Método de Tukey  $p < 0,05$ ) quanto por tratamento (ANOVA *repeated measures*,  $F = 7,94$  Método de Tukey  $p < 0,05$ ) mostrou que não haviam diferenças significativas entre o controle e a água dos tanques

contaminados com DMA<sup>®</sup>. Após 21 dias, a sobrevivência e a consequente reprodução nos outros tratamentos contaminados aumentaram, com produção de neonatas no tratamento da vinhaça com 21, 30 e 75 dias após a contaminação. Os tratamentos com fipronil isolado e em mistura (apenas com o herbicida) só tiveram fêmeas vivas até o oitavo dia, com 45 e 75 dias. No entanto, com 45 dias poucas fêmeas sobreviveram e reproduziram, com média de produção de neonatas para fipronil isolado e em mistura de uma e duas neonatas, respectivamente. A mistura com a vinhaça não manteve as fêmeas vivas em nenhum dos tempos mais do que 72 horas para a reprodução ser avaliada. A Figura 28 apresenta o perfil de toxicidade dos tratamentos após 21 dias a partir da média de neonatas produzidas.

A comparação estatística dos tratamentos após 21 dias mostrou que todos os tratamentos contaminados com exceção do herbicida foram estatisticamente diferentes do controle em todos os tempos testados após a contaminação. A vinhaça e os tratamentos com fipronil estiveram no mesmo teste apenas no último teste (75 dias) e não foram estatisticamente diferentes entre si. Regent<sup>®</sup> e mistura são diferentes entre si no teste de 45 dias.

**Figura 28.** Média de produção de neonatas por tratamentos após 21 dias da contaminação. As letras em cima das barras representam os tratamentos que eles são diferentes estatisticamente, sendo: Controle (C), DMA<sup>®</sup> (D), Regent<sup>®</sup> (F), Mistura (M) e Vinhaça (V)



A análise de cada tratamento ao longo do tempo mostrou que todos eles apresentaram alguma diferença significativa entre suas amostragens (Figura 29). Nos tratamentos que não apresentaram efeitos tóxicos para a espécie, essas variações podem ser flutuações provocadas pela variação da composição da água dos mesocosmos. Fatores físicos e químicos como temperatura, oxigênio dissolvido e pH são extremamente importantes na avaliação da toxicidade de uma solução-teste para dafinídeos (NEBEKER et al., 1992; VIJVERBERG;



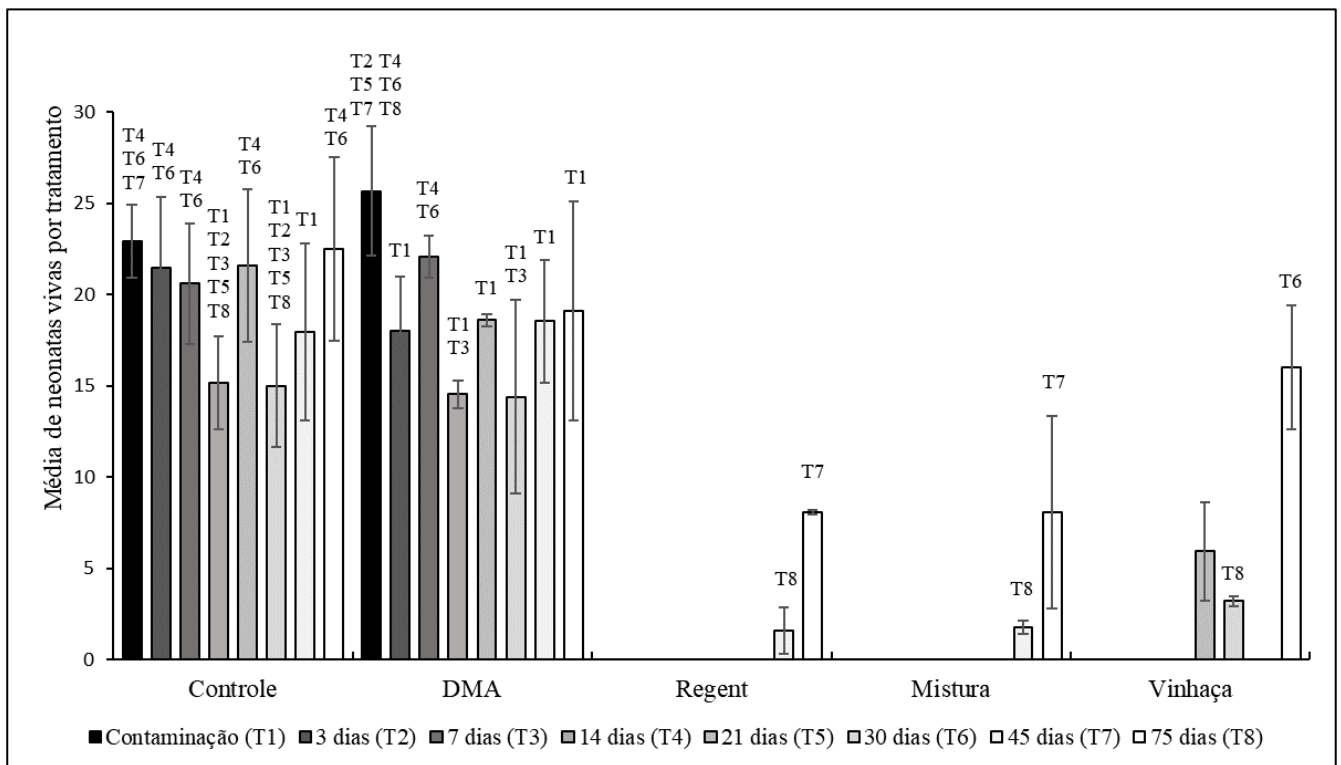
KALF; BOERSMA, 1996; SILVA; DAAM; GUSMAO, 2020). Os dois primeiros fatores citados acima foram controlados no experimento de laboratório e o pH estava em uma faixa adequada para os organismos avaliados, sendo assim, estes critérios não parecem ser os responsáveis pela diferença na reprodução nos diferentes testes. Brandão et al. (2012) acompanharam a flutuação de *Daphnia laevis*, uma espécie de clima tropical, em um lago durante seis anos avaliando os fatores responsáveis pela variação na população. Parâmetros como temperatura, concentração de clorofila *a*, fósforo total e população de um predador apresentaram correlação significativa na flutuação da espécie no ambiente. Mergeay et al. (2006) realizaram um levantamento da distribuição de dáfnias e composição da comunidade zooplanctônica em uma região tropical e observaram que os principais aspectos que explicavam a variação na distribuição das espécies foram a predação, temperatura, cobertura de macrófitas e altitude. Outros fatores estão conectados com os observados como pH, condutividade, profundidade dos corpos d'água e competição de nutrientes disponíveis entre as plantas aquáticas e o fitoplâncton.

No presente trabalho, uma comparação entre variáveis físicas e químicas de duas coletas (21 e 30 dias após a contaminação) significativamente diferentes do controle e do tratamento contaminado com o herbicida mostrou algumas diferenças expressivas de alguns fatores para cada um dos tratamentos. No caso do controle, para a coleta de 30 dias, quatro parâmetros aumentaram consideravelmente, sendo eles: fósforo total (3x), fosfato inorgânico (11x), fosfato total dissolvido (3x) e amônia (2x) e dois diminuíram, como clorofila *a* (1,6x) e clorofila *b* (1,5x), correspondendo a dois dos fatores citados no trabalho de Brandão et al. (2012). Para o DMA®, a média dos parâmetros não teve tantas diferenças como o controle, apenas dois fatores tiveram diferenças maiores: redução do fosfato total dissolvido (1,7x) e aumento do nível de nitrato nas amostras (1,5x). Mesmo com a composição das amostras do controle e herbicida sendo diferentes, a média da produção de neonatas foi bem próxima em todas as coletas e praticamente seguiu o mesmo padrão (Figura 29). Neste sentido, acredita-se que as variações que ocorreram entre os testes podem ter sido uma variação natural da sensibilidade do cultivo estabelecido em laboratório, onde uma exposição a um novo meio, sem uma aclimação anterior, potencializou estes desvios.

Com relação aos outros tratamentos contaminados, o perfil de toxicidade é similar aos testes agudos. Como citado anteriormente, a concentração de fipronil entre as coletas de 45 e 75 dias teve uma grande diferença, fator que pode explicar também o aumento da reprodução entre eles. No caso da vinhaça, assim como nos testes agudos, a toxicidade não seguiu uma sequência temporal, já que em 45 dias ela foi maior que nas coletas anteriores. Neste caso

específico o efeito tóxico foi agudo e não foi possível avaliar a reprodução. Para os outros tratamentos, a depuração ao longo do tempo do resíduo pode ser responsável pela média de produção de neonatas ser próxima ao controle com 75 dias.

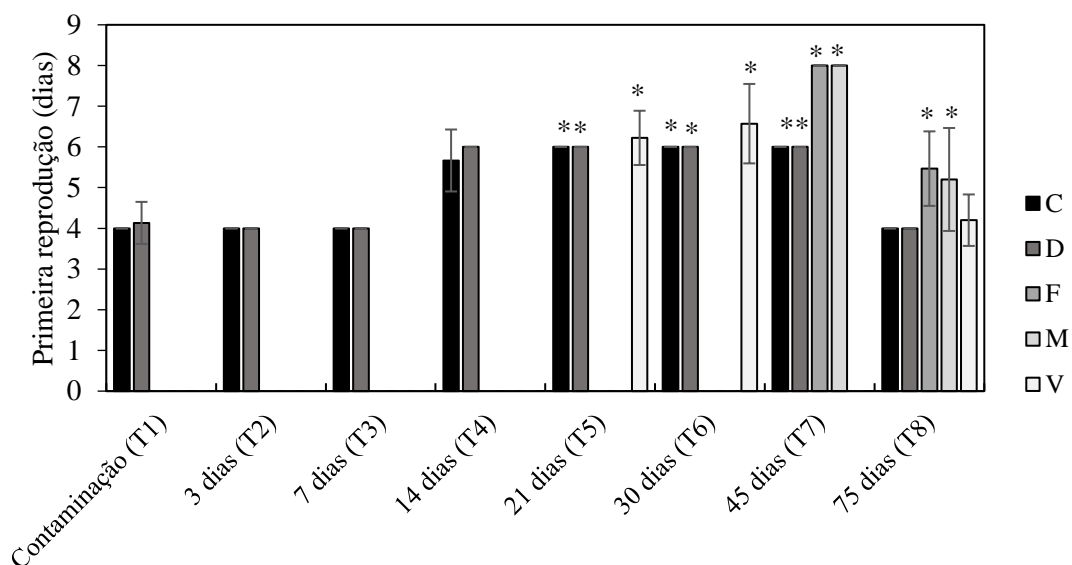
**Figura 29.** Comparação das médias da produção de neonatas por fêmea de *C. silvestrii* nos testes crônicos com amostras dos mesocosmos. Os códigos do gráfico em cima de cada barra representam de qual amostragem cada uma é diferente estatisticamente, sendo: Controle (C), DMA<sup>®</sup> (D), Regent<sup>®</sup> (F), Mistura (M) e Vinhaça (V).



A análise da primeira ninhada e da taxa intrínseca de aumento populacional ( $r$ ) mostraram um perfil similar aos resultados obtidos através da média de neonatas produzidas, onde, o controle e o tratamento contaminado com o herbicida tiveram respostas similares. Para a primeira ninhada, a análise dos dados estatísticos (ANOVA *repeated measures*,  $F = 51,11$  depois da correção de Greenhouse-Geisser com método de Tukey  $p < 0,05$ ) apontou que ocorreram atrasos na geração de neonatas em todos os tratamentos ao longo das amostragens. Normalmente, a adulta de *C. silvestrii* gera as primeiras neonatas entre o terceiro e o quarto dia de vida (FONSECA; ROCHA, 2004). Nos testes realizados, até os tratamentos que não apresentaram nenhum efeito nos outros quesitos tiveram atraso na reprodução, como é o caso do controle e do DMA<sup>®</sup>. Como citado anteriormente no tópico 6.3.2, atrasos na primeira ninhada podem interferir nas taxas de aumento populacional, desequilibrando a cadeia trófica presente no sistema aquático. No caso dos tratamentos controle e DMA<sup>®</sup>, acredita-se que este

atraso pode estar relacionado com a sensibilidade e a inserção dos organismos em um meio complexo do qual as gerações anteriores não estavam aclimatadas. A média da concentração de herbicida no tratamento contaminado é bem distante dos efeitos crônicos mensurados nos testes laboratoriais e a reprodução não é menor que a mínima aceitável para um tratamento não contaminado (média de 15 neonatas por fêmea JACONETTI, P. C. M., 2005). No entanto, para os tratamentos com fipronil e vinhaça, acredita-se que a associação dos fatores físicos e químicos com a contaminação foram estressantes o suficiente para a fêmea investir mais recursos sobrevivendo do que reproduzindo. A figura 29 apresenta a média da primeira ninhada de cada tratamento ao longo do tempo.

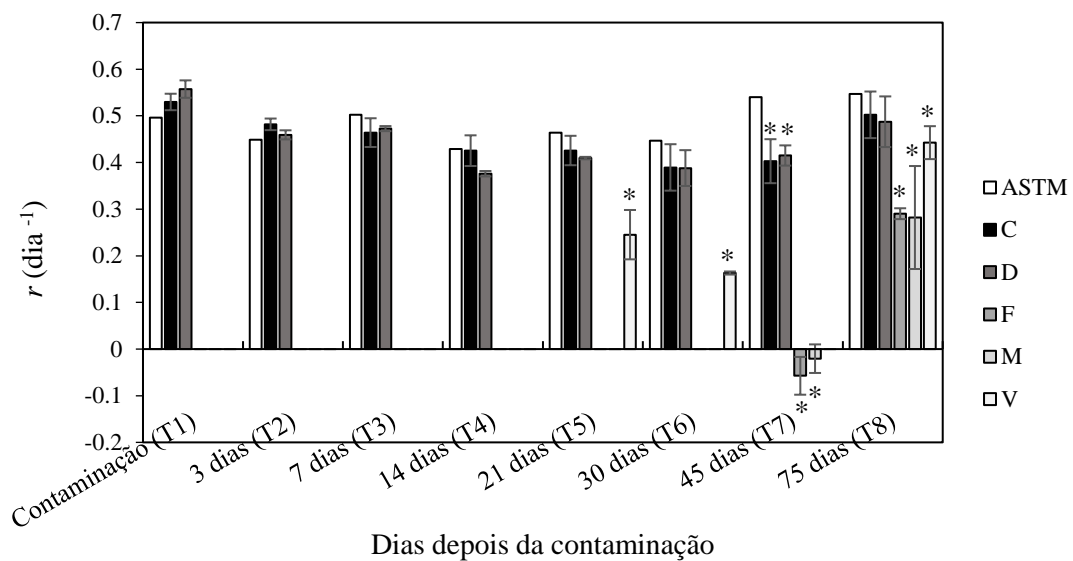
**Figura 30.** Média em dias da primeira reprodução das fêmeas ao longo da amostragem. O asterisco (\*) indica quando o tratamento foi diferente da média padrão estabelecida em laboratório para a espécie (4 dias). As letras na legenda representam os tratamentos Controle (C), DMA® (D), Regent® (F), Mistura (M) e Vinhaça (V).



A respeito dos valores de  $r$ , a análise estatística (ANOVA *repeated measures*,  $F = 40,64$  com Método de Tukey  $p < 0,05$ ) mostrou que na comparação com o controle laboratorial, com exceção de DMA® isolado, todos os tratamentos contaminados foram significativamente diferentes. A média dos controles e dos tanques com herbicida só foram estatisticamente diferente do controle laboratorial em 45 dias com taxas em 25 e 23% menores. Os tratamentos de Regent® e mistura tiveram a taxa de negativa nesta mesma amostragem, e com valores de 47 e 48 % menores comparados ao controle laboratorial. No tratamento da vinhaça, os valores variaram com relação ao controle laboratorial 47 % na com 21 dias, 63 % com 30 dias e 19 % na última coleta com 75 dias após a contaminação. Como citado anteriormente, alterações nas taxas de  $r$  associadas com atrasos na produção de ninhadas podem afetar a distribuição da

espécie no ambiente. Isso pode interferir não somente em níveis populacionais, mas também comunitários, onde fatores como competição e predação são aspectos importantes para manter o equilíbrio do ecossistema. O resumo das mudanças das taxas ao longo do tempo é mostrado na figura abaixo.

**Figura 31.** Média dos valores da taxa intrínseca de aumento populacional ( $r$ ) para cada tratamento ao longo das amostragens. O asterisco (\*) indica quando o tratamento foi diferente dos valores obtidos para o controle de laboratório (ASTM). As letras na legenda representam os tratamentos Controle (C), DMA<sup>®</sup> (D), Regent<sup>®</sup> (F), Mistura (M) e Vinhaça (V).



A respeito dos estudos de toxicidade de agrotóxicos realizados em micro e mesocosmos, existem um número considerável de avaliações que se preocupam em analisar os efeitos tóxicos no zooplâncton (e. g. DAY; KAUSHIK; SOLOMON, 1987; FAIRCHILD; LA POINT; SCHWARTZ, 1994; SMIT; VONK, 2008; HAYASAKA et al., 2012a, 2012c), já que espécies que integram este grupo de organismos costumam ser extremamente sensíveis, como os cladóceros (HANAZATO, 1991; GOLOMBIESKI et al., 2008; RELYEA, 2009). No entanto, apesar de regiões tropicais possuírem uma elevada diversidade de espécies e uma alta produção agrícola, existem poucos estudos *in situ* com a avaliação da ecotoxicidade de agrotóxicos em cladóceros tropicais (LOPES et al., 2007; CASALI-PEREIRA et al., 2015; MOREIRA et al., 2017). A maioria deles são avaliações em modelos de ecossistemas de clima temperado (e. g. HANAZATO, 1991; ROHR; CRUMRINE, 2005; BRINK et al., 2009), com efeitos potencializados em misturas que continham inseticidas (RELYEA, 2009; BJERGAGER et al., 2012), como é o caso do presente trabalho com fipronil.

Sobre os efeitos tóxicos observados em micro e mesocosmos para as comunidades zooplanctônicas, são observadas alterações na sobrevivência, reprodução (BJERGAGER et al., 2012), comportamento alimentar, densidade (DAY; KAUSHIK; SOLOMON, 1987) e abundância das populações (CHOUNG et al., 2013). Influências nestes aspectos da vida dos organismos podem alterar sua interação com outros grupos do ecossistema, como competição e predação (LIESS; FOIT, 2010), desequilibrando a cadeia trófica do ecossistema.

No caso de 2,4-D, as duas referências encontradas corroboram com os resultados deste trabalho, onde não foram encontrados efeitos pronunciados na exposição isolada. Boyle (1980), avaliou o efeito de duas concentrações do herbicida para as comunidades aquáticas e não encontrou diferenças na composição dos crustáceos dos mesocosmos. O mesmo ocorreu no estudo de Relyea (2009) que também não observou efeitos para a comunidade zooplanctônica com o herbicida isolado. Contudo, a mistura de cinco herbicidas teve efeito sobre copépodes, mas acredita-se que seja mais um efeito aditivo de outros herbicidas mais tóxicos, como a atrazina, do que algum efeito indireto de 2,4-D. Neste estudo o gênero *Ceriodaphnia* foi sensível a todos os inseticidas avaliados, *D. pulex* a dois deles e copépodes a apenas um. No entanto, a mistura foi tóxica para todos, e assim como no presente estudo, os inseticidas foram os responsáveis pela toxicidade dos mesocosmos para o zooplâncton.

Para fipronil, Wirth et al. (2004) em uma avaliação de mesocosmos estuarino, mensuraram os efeitos do inseticida para diversas espécies da comunidade estuarina incluindo o camarão *Palaemonetes pugio*. Fipronil provocou 100 % de mortalidade na concentração mais alta (5 µg/L) para o crustáceo, além da diminuição do número de fêmeas nas outras concentrações. Após a aplicação, o tratamento de maior concentração permaneceu tóxico para o camarão por seis semanas, enquanto para as outras espécies nenhum efeito foi evidenciado em nenhum momento da amostragem. No caso do presente trabalho, os mesocosmos deixaram de ser tóxicos na sobrevivência apenas com 75 dias (10 semanas) e no caso da reprodução, os efeitos continuaram pronunciados mesmo após o fim da amostragem, reafirmando a alta toxicidade deste inseticida para estes organismos.

Em ambiente de água doce, Hayasaka et al. (2012a) avaliaram mudanças ecológicas provocadas por imidacloprido e fipronil em mesocosmos após aplicação de campo. Os resultados obtidos mostraram que não ocorreram diferenças significativas na abundância do zooplâncton ao longo do período experimental. Porém, as concentrações na água após a aplicação de campo eram inferiores a 1 µg/L, o que pode não ter efeito tóxico para maioria dos cladóceros de clima temperado em experimentos de curto prazo (STARK; VARGAS, 2005; NAKAGOME; NOLDIN; JR, 2006; HAYASAKA et al., 2012b). Além disso, a maioria dos

crustáceos do zooplâncton neste estudo eram ostracodes, com poucos cladóceros e copépodes presentes nas amostragens. Experimentos no laboratório do presente estudo, mostram que ostracodes podem ser mais resistentes ao fipronil do que dafinídeos, com valores de  $CE_{50}$  na escala de mg/L (PINTO, 2019 dados não publicados).

Em contrapartida, os mesmos autores acompanharam os efeitos a longo prazo (dois anos) após uma segunda aplicação dos agrotóxicos e observaram impactos cumulativos nas comunidades do zooplâncton (HAYASAKA et al., 2012c). Neste sentido, ambos resultados mostram que embora estudos de mesocosmos colaborem pra uma melhor predição dos efeitos dos agrotóxicos nos ecossistemas, ainda assim, dependendo da metodologia eles podem subestimar os efeitos a longo prazo. Portanto, é extremamente importante que contaminantes que demonstram toxicidade em concentrações relevantes ambientalmente como o fipronil, devem ser avaliados em todos os *endpoints* relevantes para espécies sensíveis como *C. silvestrii*.

Com relação aos parâmetros físicos e químicos medidos em laboratório, a média de cada tratamento do mesocosmos ao longo do tempo é apresentada na tabela abaixo:

**Tabela 11.** Média dos parâmetros das amostras coletadas em mesocosmos. As letras representam os tratamentos do Controle (C), DMA<sup>®</sup> (D), Regent<sup>®</sup> (F), Mistura (M), Vinhaça (V) e Mistura com vinhaça (MV).

		Pré								
		cont.	Cont.	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias	45 dias	75 dias
<b>C</b>	pH	6,8	7,1	7,2	7,1	7,0	6,8	6,9	7,0	7,4
	OD (mgO <sub>2</sub> /L)	7,6	7,3	6,9	7,0	7,3	7,7	7,8	7,6	7,5
	Condutividade (µs/cm)	15,3	28,8	27,3	34,1	34,6	56,7	35,8	39,9	45,7
<b>D</b>	pH	6,8	7,2	7,3	7,0	6,9	6,9	6,9	6,9	7,1
	OD (mg O <sub>2</sub> /L)	7,5	7,3	6,8	7,0	7,4	7,5	7,9	7,5	7,5
	Condutividade (µs/cm)	14,8	28,8	29,8	35,3	41,2	46,6	46,1	47,7	53,3
<b>F</b>	pH	6,8	7,1	7,1	6,9	6,7	6,9	6,8	7,0	7,4
	OD (mg O <sub>2</sub> /L)	7,8	7,2	6,9	7,0	7,3	7,5	7,6	7,8	7,7
	Condutividade (µs/cm)	13,2	30,0	30,9	65,6	34,2	42,9	43,4	51,1	70,2
<b>M</b>	pH	6,9	7,3	7,2	7,0	6,8	6,9	6,9	7,0	7,3
	OD (mg O <sub>2</sub> /L)	7,6	7,3	6,8	6,9	7,3	7,4	7,6	7,6	7,6
	Condutividade (µs/cm)	19,9	33,8	35,4	41,9	48,7	56,8	60,8	66,4	80,1
<b>V</b>	pH	6,7	5,7	5,9	6,0	6,2	6,9	7,3	7,4	7,3
	OD (mg O <sub>2</sub> /L)	7,6	5,6	3,2	3,3	2,4	4,5	6,8	6,0	6,9
	Condutividade (µs/cm)	14,7	159,2	401,3	433,0	459,7	492,0	480,7	539,0	325,9
<b>MV</b>	pH	6,7	5,6	5,9	6,0	6,3	6,8	7,1	7,2	7,6
	OD (mg O <sub>2</sub> /L)	7,6	5,6	3,0	3,2	2,9	4,3	3,2	3,5	7,5
	Condutividade (µs/cm)	14,8	217,7	407,7	425,7	449,0	466,7	503,3	526,3	379,3

Analisando as médias dos parâmetros do controle, DMA<sup>®</sup>, Regent<sup>®</sup> e mistura observa-se que dentre os três, a condutividade foi o fator que mais teve diferenças ao longo da amostragem. Provavelmente este resultado se deu pela decomposição de macrófitas que subiu drasticamente ao longo da amostragem, e no caso do Regent<sup>®</sup> e da mistura, também da decomposição e alta mortalidade do zooplâncton e outros invertebrados que habitavam o sistema. Experimentos anteriores com o herbicida linurom mostraram que a inibição da fotossíntese de macrófitas e algas, ocasionaram em diminuição dos níveis de OD e pH, além do aumento da alcalinidade e da condutividade (CUPPEN et al., 1997; DAAM et al., 2009). Hipótese que pode ser aplicada a este trabalho em relação as macrófitas.

No caso da vinhaça e da mistura da vinhaça, além dos fatores citados acima também havia todo conteúdo da composição da vinhaça (Tabela 5), que além de aumentar os valores de condutividade provavelmente colaboraram para o consumo do oxigênio do sistema por microrganismos ou a complexação dele em outras moléculas.

### **6.3.5. Testes pós-exposição: alimentação com *R. subcapitata* e reprodução**

#### **6.3.5.1. Alimentação**

Os testes de alimentação foram divididos em dois blocos: os que foram realizados com organismos expostos aos tratamentos em mesocosmos e os que passaram pela exposição em laboratório. Neste sentido, quatro testes de alimentação foram realizados com os organismos expostos aos mesocosmos (contaminação até 14 dias) e outros quatro para aqueles provenientes dos testes em laboratório (14 dias até 75 dias após a contaminação) já que não foi mais possível avaliar este *endpoint* com organismos provenientes dos mesocosmos.

A análise estatística dos experimentos com as fêmeas retiradas dos testes em mesocosmos (ANOVA *repeated measures*,  $F = 21,08$  depois da correção de Greenhouse-Geisser com método de Tukey  $p < 0,05$ ) mostrou que dos quatro testes realizados, a taxa de alimentação das fêmeas do controle diferenciou-se das que foram expostas ao DMA<sup>®</sup> isolado, apenas em um deles (48 horas após a contaminação). No quarto teste (14 dias), também houve sobreviventes nos tratamentos com Regent<sup>®</sup> e na mistura. E na comparação do controle com esses tratamentos, as fêmeas expostas ao inseticida isolado tiveram o dobro da taxa de alimentação dos organismos que estavam no controle, enquanto as fêmeas da mistura não apresentaram diferenças significativas (Tabela 12).

Com relação a continuidade dos testes realizados com a exposição em laboratório, a análise realizada (ANOVA *repeated measures*,  $F = 69,10$  depois da correção de Greenhouse-Geisser

com método de Tukey  $p < 0,05$ ) apontou que o controle não apresentou diferenças estatísticas com os tratamentos contaminados, com exceção de DMA<sup>®</sup> no primeiro teste (14 dias), com menor taxa que ele. Entre os tratamentos contaminados, ocorreu diferença entre DMA<sup>®</sup> e Regent<sup>®</sup> no primeiro teste, com a taxa maior das fêmeas expostas ao herbicida. A mistura apresentou maior taxa que o inseticida e a mistura com vinhaça no segundo teste (21 dias). No caso da mistura da vinhaça é possível concluir que a presença da vinhaça na exposição pode ter diminuído a capacidade de filtração dos organismos no pós-exposição como fator aditivo de toxicidade. Mas entre o inseticida e a mistura não é evidente a razão da diferença, pois esta hipótese automaticamente exclui qualquer hipótese do porquê fipronil aumentou a taxa com 14 dias das fêmeas expostas em mesocosmos. O tratamento da vinhaça foi o único que não apresentou diferença com nenhum dos tratamentos.

**Tabela 12.** Média da taxa de alimentação de *C. silvestrii* após exposição em mesocosmos e laboratório aos tratamentos avaliados no experimento. O asterisco representa a diferença estatística com o controle

	Cont.	48 horas	1ª sem.	2ª sem. (a)	2ª sem. (b)	3ª sem.	45 dias	75 dias
	Células/organismos/hora							
<b>Controle</b>	8,6 x10 <sup>3</sup>	9,7 x10 <sup>3</sup>	2,8 x10 <sup>3</sup>	2,7 x10 <sup>3</sup>	3,0 x10 <sup>3</sup>	2,4 x10 <sup>3</sup>	1,9 x10 <sup>3</sup>	1,5 x10 <sup>3</sup>
<b>DMA<sup>®</sup></b>	7,5 x10 <sup>3</sup>	2,8 x10 <sup>3*</sup>	3,4 x10 <sup>3</sup>	1,9 x10 <sup>3</sup>	5,3 x10 <sup>3*</sup>	2,6 x10 <sup>3</sup>	2,6 x10 <sup>3</sup>	1,4 x10 <sup>3</sup>
<b>Regent<sup>®</sup></b>	-	-	-	6,1 x10 <sup>3*</sup>	2,2 x10 <sup>3</sup>	2,1 x10 <sup>3</sup>	1,1 x10 <sup>3</sup>	8,3 x10 <sup>2</sup>
<b>Mistura</b>	-	-	-	2,9 x10 <sup>3</sup>	-	4,0 x10 <sup>3</sup>	2,1 x10 <sup>3</sup>	1,6 x10 <sup>3</sup>
<b>Vinhaça</b>	-	-	-	-	-	3,4 x10 <sup>3</sup>	-	1,4 x10 <sup>3</sup>
<b>Mistura + Vinhaça</b>	-	-	-	-	-	2,2 x10 <sup>3</sup>	2,1 x10 <sup>3</sup>	1,2 x10 <sup>3</sup>

A avaliação da taxa de alimentação em cladóceros na exposição ou pós-exposição a substâncias tóxicas é bastante difundida na ecotoxicologia, com estudos analisando o efeito de, por exemplo, metais (TAYLOR; BAIRD; SOARES, 1998), sais (SOUCEK, 2007), fármacos (LU; LI; LIU, 2013) e agrotóxicos (FERNANDEZCASALDERREY; FERRANDO; ANDREUMOLINER, 1994).

Os estudos disponíveis na literatura têm demonstrado que este *endpoint* na maior parte dos casos é mais sensível que a avaliação da mortalidade e reprodução (TAYLOR; BAIRD; SOARES, 1998; BARATA; BAIRD, 2000; PEREIRA; CEREJEIRA; DAAM, 2017). A obtenção de energia através da alimentação é um importante fator que pode afetar a estrutura e a dinâmica da população. Alterações na taxa de ingestão de alimento à nível individual determinam a taxa de desenvolvimento, crescimento, reprodução e sobrevivência dos



organismos (MALTBY, 1994), por essa razão ela pode ser um ponto chave na avaliação da toxicidade de uma substância para uma espécie.

No presente trabalho, não houve efeito na alimentação em todos os tratamentos e em todos os tempos amostrais. As taxas de filtração nas amostragens isoladas do herbicida, quando diferentes do controle, foram menores em um teste e maiores em outro. O inseticida isolado teve o dobro da taxa de filtração do controle em uma coleta, mas o resultado não se repetiu em nenhum outro teste. A redução da capacidade de ingerir alimento após a exposição a uma contaminante é a resposta mais comum encontrada na literatura (DAY; KAUSHIK, 1987; FERREIRA; LOUREIRO; SOARES, 2008; LOUREIRO et al., 2010). Em contrapartida, o aumento da taxa de alimentação após a exposição pode demonstrar a tentativa dos organismos de se recuperar dos efeitos causados pelo tóxico (ARAUJO et al., 2019).

Para 2,4-D, dois estudos avaliaram sua influência na taxa de alimentação de *D. magna* (DE COEN; JANSSEN, 1998; FOCHTMAN; RASZKA; NIERZEDSKA, 2000). Os valores de  $CE_{50}$  e  $CI_{50}$  foram de 93 e 12,9 mg/L, respectivamente, sendo o valor mais alto para o ingrediente ativo e o menor para o herbicida Aminopielik 600 SL, demonstrando que o produto formulado foi mais tóxico para a espécie. Nos experimentos realizados com *C. silvestrii*, a média das concentrações quantificadas de herbicida não ultrapassaram o máximo de 1,38 mg/L, fator que pode ter sido determinante para não ter sido detectado nenhum efeito pronunciado na taxa de alimentação da espécie.

No caso do fipronil, não foram encontradas referências de experimentos de alimentação para cladóceros. Em geral, os inseticidas através de seu mecanismos de ação, são substâncias com potencial para alterar a taxa de ingestão de alimento de dafnídeos, já que a alimentação destes organismos é dependente do movimento do apêndice que é coordenado pela sistema nervoso que pode ter sua função prejudicada pela exposição aos pesticidas (VILLARROEL et al., 1999). Diversos tipos de inseticidas já foram avaliados pelo seu potencial de influenciar este ponto final de avaliação, como por exemplo, inseticidas carbamatos (AGATZ; BROWN, 2013), neonicotinóides (AGATZ et al., 2013), organofosforados (FERNANDEZCASALDERREY; FERRANDO; ANDREUMOLINER, 1994) e piretróides (MCWILLIAM; BAIRD, 2002). Para fipronil, acredita-se que uma avaliação laboratorial sem a gama de interações disponíveis em um experimento em mesocosmos, pode ajudar a elucidar se realmente não há nenhuma influência deste composto na taxa de alimentação de *C. silvestrii*.

Para a vinhaça, também não foram encontrados trabalhos que avaliaram este *endpoint*, no entanto, uma avaliação realizada com efluentes com alta carga de carbono orgânico total, mostrou que efluentes com esse fator atrelado podem ser mais tóxicos do que agrotóxicos para

*D. magna* (BARATA et al., 2008). Misturas de agrotóxicos com metais mostram-se mais tóxicas que agrotóxicos isoladamente (BARATA et al., 2006), sendo assim, uma avaliação mais robusta com avaliação na exposição e pós-exposição seria uma proposta interessante para estudos futuros com todos os compostos utilizados neste trabalho.

### **6.3.5.2. Reprodução**

Durante os testes preliminares com DMA<sup>®</sup> observou-se a total inibição da reprodução das fêmeas expostas a duas concentrações-teste 90 e 110 mg/L, através disso um teste adicional de reprodução foi realizado com as fêmeas destes tratamentos. Sendo assim, as fêmeas sobreviventes das duas concentrações seguiram em recipientes individuais por mais sete dias.

Após 48 horas da retirada dos organismos do meio contaminado, metade das fêmeas já geraram prole (Tabela 13). Das fêmeas que estavam anteriormente na concentração de 90 mg/L, três das oito fêmeas sobreviventes geraram uma prole onde algumas neonatas não sobreviveram. No caso das fêmeas que estavam em 110 mg/L, das três que geraram neonatas, duas delas morreram. No primeiro caso, e também nas outras trocas onde a primeira ninhada apresentou neonatas mortas, significa que provavelmente estes organismos ainda na fase de desenvolvimento sofreram danos com a exposição ao agrotóxico. Sabe-se que produtos químicos interferem na viabilidade dos ovos (MCWILLIAM; BAIRD, 2002), neste sentido, acredita-se que os prejuízos causados foram suficientes para causar a morte prematuras das neonatas.

As fêmeas que geraram prole em 48 horas, não geraram em 96 horas. Na finalização do teste pós-exposição do grupo que tinha sido exposto a 90 mg/L do herbicida, apenas duas fêmeas geraram duas ninhadas, no entanto com número desproporcional ao encontrado normalmente. A observação das fêmeas no esteriomicroscópio mostrou (Figura 32), duas fêmeas sem ovos (4 e 9), três com ovos em diferentes estados de maturação (1,3 e 7), porém visualmente deformados e uma com neonatas mortas dentro (2). Apesar de desde o início da contaminação até o final do teste pós- exposição 60 % das fêmeas deste grupo sobreviverem, pensando em uma contaminação pontual que gere efeitos como os observados, o futuro da espécie naquele local seria difícil de prever.

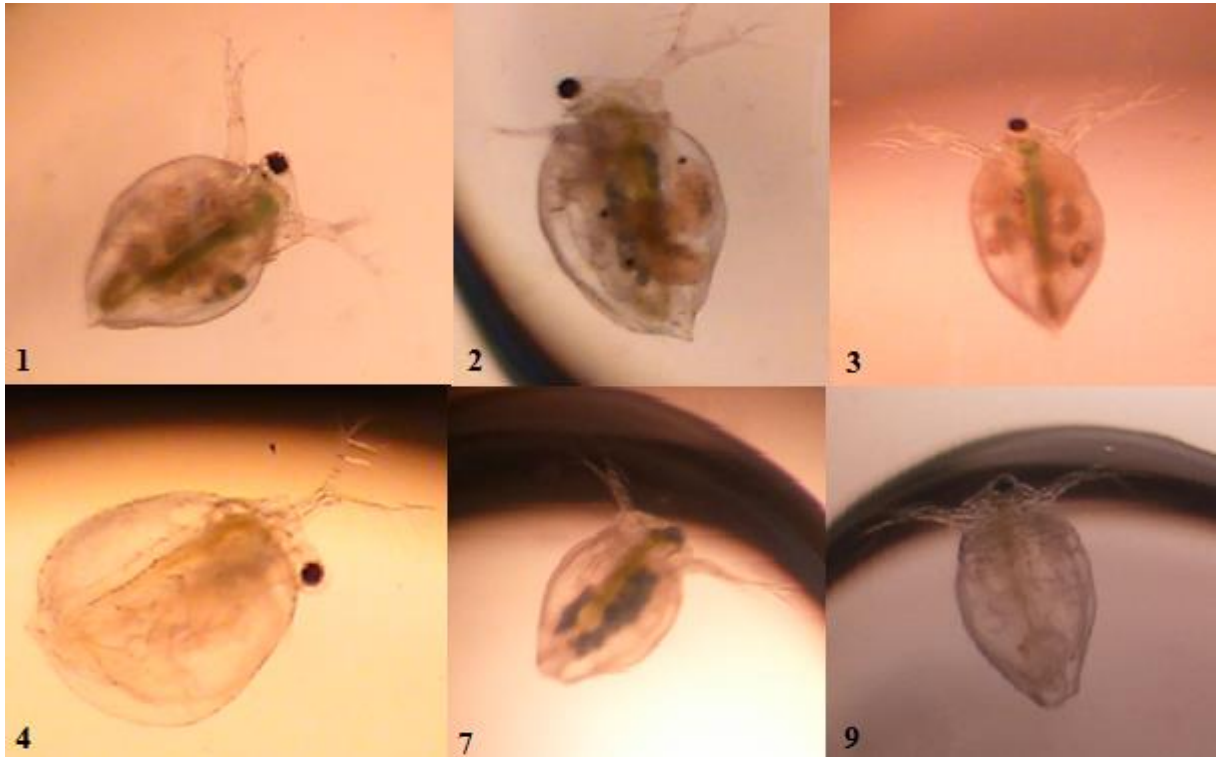
Após 96 horas do início do teste, as quatro fêmeas que não haviam gerado neonatas apresentaram a mesma situação que foi observada no outro grupo, onde haviam neonatas vivas e mortas. A diferença é que neste caso, as fêmeas estavam mortas também, apenas uma delas

sobreviveu. Sendo assim, no final do experimento apenas três fêmeas deste grupo sobreviveram (Figura 32). Duas delas geraram outras neonatas e estavam com ovos em seu interior (7 e 9) e a última estava sem ovos sendo que fazia 96 horas da sua última prole (5). Em um ambiente sem contaminação isso dificilmente acontece, a geração da prole geralmente ocorre de 48 em 48 horas, com a formação constante de ovos.

**Tabela 13.** Produção de neonatas de cada fêmea durante o experimento de reprodução pós-exposição. Os números em vermelho significam a morte da adulta.

Produção de neonatas						
Fêmea (réplica)	DMA <sup>®</sup> mg/L	Vivas 1º troca	Mortas 1º troca	Vivas 2º troca	Mortas 2º troca	Vivas 3º troca
1	90	6	4	0	0	5
2		8	0	0	0	0
3		6	5	0	0	0
4		7	3	1	0	0
5		0	0	5	3	0
6		0	0	1	5	-
7		5	0	0	0	3
8		0	0	-	-	-
9		0	0	6	0	0
1	110	0	0	3	1	-
2		0	0	4	5	-
3		7	0	-	-	-
4		2	0	-	-	-
5		7	0	0	0	0
6		0	0	-	-	-
7		0	0	10	0	1
8		0	0	4	4	-
9		4	0	0	0	5

**Figura 32.** Fêmeas sobreviventes exposta anteriormente a concentração de 90 mg/L de 2,4-D ao final do teste pós-exposição (réplica 1,2,3,4,7 e 9)



**Figura 33.** Fêmeas sobreviventes exposta anteriormente a concentração de 110 mg/L de 2,4-D ao final do teste pós-exposição (réplica 5, 7 e 9)



Com relação ao teste pós-exposição de reprodução com os organismos que passaram pela exposição aguda em mesocosmos, foram realizados quatro testes com as fêmeas que foram inseridas: no dia da contaminação, 3, 7 e 21 dias após a contaminação. A análise estatística entre o controle e o tratamento com DMA<sup>®</sup> (únicos tratamentos com fêmeas vivas para a realização do teste) não mostraram diferenças significativas entre eles em nenhum dos testes realizados (ANOVA *repeated measures*,  $F = 70,54$  depois da correção de Greenhouse-Geisser com método de Tukey  $p = 0,17$ ).

Uma comparação da produção de neonatas entre essas fêmeas e as que foram inseridas nas amostras em laboratório e permaneceram durante os oito dias de um teste crônico no meio

contaminado também foi realizada, afim de verificar as diferenças entre pós-exposição curta e permanência longa na solução teste. Para isso, os dois grupos de dados de cada amostragem foram comparados, ou seja, fêmeas inseridas no mesocosmos na contaminação e fêmeas inseridas nas amostras da contaminação em laboratório e assim por diante. A análise estatística mostrou diferenças na produção das fêmeas da contaminação e de 72 horas após, tanto para o controle (Test t:  $p = 0,004$  e  $p = 0,000001$ ) quanto para DMA<sup>®</sup> (Test t:  $p = 0,0005$  e  $p = 0,04$ ). Em ambos, as fêmeas que estiveram em campo reproduziram menos do que as foram expostas em laboratório. Existem diversos fatores que podem estar envolvidos neste resultado, como por exemplo, aclimatação aos fatores físicos e químicos da solução-teste e manipulação dos organismos, no entanto, eles não parecem que seguiram um padrão já que não ocorreram diferenças nos quatro testes. Independente destas diferenças, conclui-se que para o herbicida provocar prejuízos reprodutivos pós-exposição é necessário altas concentrações na faixa de mg/L.

Na literatura, experimentos pós-exposição com a metodologia de retirar os organismos do meio contaminado e colocá-los em outra solução-teste ainda é pouco difundida. Mesmo assim, experimentos realizados com algumas espécies incluindo cladóceros mostram que a exposição de curta duração a agrotóxicos, pode trazer prejuízos individuais e populacionais às espécies ao longo da vida (LIESS, 2002; LIESS; PIETERS; DUQUESNE, 2006; BEKETOV; LIESS, 2008). Estes prejuízos podem se estender para vários grupos presentes no ecossistema, desencadeando uma série de mudanças na estrutura da comunidade aquáticas. Por exemplo, uma única aplicação do inseticida deltametrina em mesocosmos fez com que populações presentes no sistema da família Daphniidae demorassem até 105 dias para se recuperar dos efeitos da contaminação (HANSON et al., 2007). Espécies mais sensíveis de macroinvertebrados não se recuperaram durante pelo menos um ano após a contaminação pelo inseticida tiacloprida (LIESS; BEKETOV, 2011). As comunidades de artrópodes, bentos, zooplânctons e peixes expostos a duas aplicações sucessivas dos inseticidas imidacloprido e fipronil sofreram efeitos tóxicos suficientes para desestabilizar o sistema até o final de um acompanhamento pós-exposição de dois anos (HAYASAKA et al., 2012b). A comunidade zooplânctônica não se recuperou principalmente no tratamento com o fipronil, isso evidencia seu alto grau de toxicidade mesmo em sistemas mais complexos.

É importante lembrar, que não é somente o tóxico que pode influenciar na capacidade de recuperação de uma população ou comunidade. A própria interação entre os organismos presentes no meio, como predação e competição, pode interferir no sucesso de uma espécie após a exposição a uma substância (HANSON et al., 2007). Foit et al. (2012) avaliaram a

pressão competitiva entre duas espécies, um cladóceros e um inseto, após a exposição ao inseticida fenvalerato. Eles observaram que uma pequena diferença na sensibilidade ao contaminante associada com a competição prejudicaram a recuperação de *D. magna*.

Neste sentido, observa-se a importância e a complexidade de experimentos em micro e mesocosmos. Além disso, acredita-se que talvez o esforço do presente trabalho em avaliar *endpoints* extremamente sensíveis como a pós-exposição e a alimentação, pode não ter sido suficiente, já que estes foram realizados com a espécie isolada e isso pode ter dificultado amostragem de efeitos que somente uma interação em nível comunitário poderia revelar.

#### 6.4. Conclusão

O presente estudo mostrou que a exposição a agrotóxicos e a vinhaça, compostos comumente utilizados no cultivo da cana-de-açúcar afeta as espécies zooplanctônicas nativa de ambientes tropicais.

Com base nas informações obtidas por meio dos testes letais e subletais, conclui-se que para o herbicida DMA<sup>®</sup> provocar algum tipo de efeito para *C. silvestrii*, as concentrações do meio precisam estar acima de 50 mg i.a./L de 2,4-D. Como visto anteriormente, concentrações como essa estão distantes dos valores que são detectados em campo. Sendo assim, outros testes mais sensíveis são necessários para descartar efeitos subletais para *C. silvestrii* na exposição ao herbicida, além da necessidade de explorar melhor em laboratório as avaliações subletais realizadas, como a alimentação por exemplo. Outro fator que deve ser considerado antes de descartar a toxicidade de 2,4-D, é que mesmo um agrotóxico não provocando efeitos tóxicos letais e subletais em uma única exposição, a exposição constante a pulsos desta substância pode causar maior propensão a mortalidade e alteração em outros parâmetros do ciclo de vida. Além disso, as amostragens de curto prazo podem mascarar efeitos a longo prazo. Sendo assim, estudos aprofundados em avaliações subletais e multigeracionais são sugeridas para os próximos passos da avaliação de 2,4-D para cladóceros nativos.

No caso de Regent<sup>®</sup> e da vinhaça, ambos exibiram alta toxicidade para *C. silvestrii*, com o inseticida apresentando valores tóxicos em concentrações frequentemente encontradas em ecossistemas aquáticos (por exemplo, causou imobilidade em 2 µg i.a./L e diminuição na taxa de reprodução em 0,8 µg i.a./L). A vinhaça, com menos de 0,5 % do volume do sistema, provocou efeitos agudos acima de 50 %. Ambos são os responsáveis pela alta mortalidade tanto nos experimentos laboratoriais de mistura como nas avaliações em mesocosmos, sendo ainda a causa principal dos efeitos que se estenderam até o final da amostragem (mortalidade de fêmeas

nos testes agudos e crônicos da mistura com vinhaça em 75 dias após a contaminação). Avaliações agudas e crônicas da mistura ternária foram muito mais tóxicas que as misturas binárias dos dois agrotóxicos. No caso das binárias, as agudas apresentaram antagonismo em baixas concentrações e sinergismo em altas concentrações, enquanto nos testes crônicos o principal resultado foi o antagonismo. Resultados como estes, que não são explicados pelo modo de ação dos ingredientes ativos, devem ser melhor explorados. Embora tenha havido um grande aumento na pesquisa sobre a toxicidade de misturas nos últimos anos, informações adicionais são necessárias para desenvolver critérios práticos para a seleção de misturas de agrotóxicos que requerem atenção adicional, como fipronil, que pode ser encontrado facilmente em ambientes naturais em doses letais. Sendo assim, outra sugestão para estudos futuros são avaliações em níveis moleculares que tentem preencher as lacunas dos mecanismos por trás da toxicidade dos agrotóxicos para espécies não-alvo. Isso pode colaborar para um melhor entendimento de suas implicações ecológicas na dinâmica das populações e favorecer as argumentações nas regulações do uso de substâncias altamente tóxicas como o fipronil, que podem facilmente colaborar para a extinção de espécies sensíveis, como *C. silvestrii*.

## Referências

ABNT. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp*** (Crustacea, Cladocera). Disponível em: <<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=368529>>.

ADAMSSON, M. et al. Toxicity Identification Evaluation of Ammonia, Nitrite and Heavy Metals at the Stensund Wastewater Aquaculture Plant, Sweden. *Water Science and Technology, Water Quality International '98 Part 3. Wastewater: Treatment plants*. v. 38, n. 3, p. 151–157, 1 jan. 1998.

AFNOR, A. F. de N. **Essais des eaux. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance**. Norme expérimentale T90-304., 1980.

AGATZ, A. et al. Feeding Inhibition Explains Effects of Imidacloprid on the Growth, Maturation, Reproduction, and Survival of *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 6, p. 2909–2917, 19 mar. 2013.

AGATZ, A.; BROWN, C. D. Evidence for Links between Feeding Inhibition, Population Characteristics, and Sensitivity to Acute Toxicity for *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 16, p. 9461–9469, 20 ago. 2013.

ALEXANDER, H. C.; GERSICH, F. M.; MAYES, M. A. Acute Toxicity of Four Phenoxy Herbicides to Aquatic Organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 314–321, set. 1985.

ALLAN, J. D. Life History Patterns in Zooplankton. **The American Naturalist**, v. 110, n. 971, p. 165–180, 1976.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Edição: 23. American Public Health Association, 2018.

ARAUJO, G. S. et al. Toxicity of Lead and Mancozeb Differs in Two Monophyletic *Daphnia* Species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 178, p. 230–238, 30 ago. 2019.

BAILEY, H. C. et al. Joint Acute Toxicity of Diazinon and Chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 2304–2308, 1997.

BANKS, K. E. et al. Increased Toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in Mixtures of Atrazine and Diazinon at Environmentally Realistic Concentrations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, n. 1, p. 28–36, 1 jan. 2005.

BARATA, C. et al. Toxicity of Binary Mixtures of Metals and Pyrethroid Insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for Multi-Substance Risks Assessment. **Aquatic Toxicology** (Amsterdam, Netherlands), v. 78, n. 1, p. 1–14, 10 jun. 2006.

BARATA, C. et al. A *Daphnia magna* Feeding Bioassay as a Cost Effective and Ecological Relevant Sublethal Toxicity Test for Environmental Risk Assessment of Toxic Effluents. **Science of The Total Environment**, v. 405, n. 1, p. 78–86, 1 nov. 2008.



BARATA, C. et al. Population Growth Rate Responses of *Ceriodaphnia dubia* to Ternary Mixtures of Specific Acting Chemicals: Pharmacological versus Ecotoxicological Modes of Action. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 17, p. 9663–9672, 4 set. 2012.

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, p. 195–209, 1 mar. 2000.

BARBA HO, L. E.; GARCÍA, L. A. **Evaluación de la factibilidad de acople de un sistema fotocatalítico biológico para el tratamiento de vinazas mediante estudios de toxicidad**. v. 11, p. 63–71, 2012.

BEKETOV, M. A.; LIESS, M. Acute and Delayed Effects of the Neonicotinoid Insecticide Thiacloprid on Seven Freshwater Arthropods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 461–470, fev. 2008.

BENIJTS-CLAUS, C.; PERSOONE, G. **The Influence of the Formulation of the Herbicide Paraquat on Its Toxicity for Aquatic Organisms**. 1975. Disponível em: <<http://www.vliz.be/en/imis?refid=3525>>. Acesso em: 28 abr. 2020.

BENLI, A. Ç. K. et al. The Sublethal Effects of (2,4-Dichlorophenoxy) Acetic Acid (2,4-D) on Narrow-Clawed Crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). **Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju**, v. 67, n. 4, p. 289–296, 1 dez. 2016.

BJERGAGER, M.-B. A. et al. Synergy between Prochloraz and Esfenvalerate in *Daphnia magna* from Acute and Subchronic Exposures in the Laboratory and Microcosms. **Aquatic Toxicology**, v. 110–111, p. 17–24, 1 abr. 2012.

BJERGAGER, M.-B. A. et al. Determining Lower Threshold Concentrations for Synergistic Effects. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 79–90, 1 jan. 2017.

BORGERT, C. J. Chemical Mixtures: An Unsolvable Riddle? Human and Ecological Risk Assessment: **An International Journal**, v. 10, n. 4, p. 619–629, 1 ago. 2004.

BORGERT, C. J. et al. Can Mode of Action Predict Mixture Toxicity for Risk Assessment? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 201, n. 2, p. 85–96, 1 dez. 2004.

BOTELHO, R. G. et al. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 2035–2045, 1 dez. 2012.

BOTTRELL, H. H. et al. **Review of Some Problems in Zooplankton Production Studies**. v. 24, p. 419–456, 1976.

BOYLE, T. P. Effects of the Aquatic Herbicide 2,4-D DMA on the Ecology of Experimental Ponds. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, v. 21, n. 1, p. 35–49, 1 jan. 1980.

BRANDÃO, L. P. M. et al. Fluctuations of the Population of *Daphnia laevis* Birge 1878: A Six-Year Study in a Tropical Lake. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 479–487, ago. 2012.

BRAUSCH, J. M.; SALICE, C. J. Effects of an Environmentally Realistic Pesticide Mixture on *Daphnia magna* Exposed for Two Generations. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 61, n. 2, p. 272–279, ago. 2011.

BRINK, P. J. van den et al. Effects of a Herbicide-Insecticide Mixture in Freshwater Microcosms: Risk Assessment and Ecological Effect Chain. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 1, p. 237–249, 2009.

BUKOWSKA, B. Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid - Molecular Mechanisms. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 3, p. 365–374, 2006.

CAMPOS, C. R. et al. Efficiency of Physicochemical and Biological Treatments of Vinasse and Their Influence on Indigenous Microbiota for Disposal into the Environment. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 2036–2046, 1 nov. 2014.

CARVALHO, W. et al. Genotoxicity of Mixtures of Glyphosate with 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Chemical Forms towards *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 27, n. 6, p. 6515–6525, 23 dez. 2019.

CASALI-PEREIRA, M. P. et al. Toxicity of Vertimec® 18 EC (Active Ingredient Abamectin) to the Neotropical Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v. 139, p. 558–564, 1 nov. 2015.

CASSEE, F. R. et al. Toxicological Evaluation and Risk Assessment of Chemical Mixtures. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 73–101, jan. 1998.

CEDERGREEN, N. et al. A Review of Independent Action Compared to Concentration Addition as Reference Models for Mixtures of Compounds with Different Molecular Target Sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1621–1632, 2008.

CETESB, C. A. do estado de S. P. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017**. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2018/06/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-das-%C3%81guas-Interiores-no-Estado-de-S%C3%A3o-Paulo-2017.pdf>>, 2018.

CHOUNG, C. B. et al. The Ecological Effects of a Herbicide–Insecticide Mixture on an Experimental Freshwater Ecosystem. **Environmental Pollution**, v. 172, p. 264–274, 1 jan. 2013.

CROSBY, D. G.; TUCKER, R. K. Toxicity of Aquatic Herbicides to *Daphnia magna*. **Science** (New York, N.Y.), v. 154, n. 3746, p. 289–291, 14 out. 1966.

CUPPEN, J. G. et al. Sensitivity of Macrophyte-Dominated Freshwater Microcosms to Chronic Levels of the Herbicide Linuron. II. Community Metabolism and Invertebrates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, n. 1, p. 25–35, out. 1997.

DA FONSECA, M. B. et al. The 2,4-D Herbicide Effects on Acetylcholinesterase Activity and Metabolic Parameters of Piava Freshwater Fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 416–420, mar. 2008.

DAAM, M. A. et al. Ecological Effects of the Herbicide Linuron in Tropical Freshwater Microcosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 410–423, 1 fev. 2009.

DAVIES, T.; HALL, K. Importance of calcium in modifying the acute toxicity of sodium sulphate to *Hyella azteca* and *Daphnia magna*. **Environmental toxicology and chemistry/SETAC**, v. 26, p. 1243–7, 1 jul. 2007.

DAY, K. E.; KAUSHIK, N. K.; SOLOMON, K. R. Impact of Fenvalerate on Enclosed Freshwater Planktonic Communities and on in situ Rates of Filtration of Zooplankton. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 44, n. 10, p. 1714–1728, 1 out. 1987.

DAY, K.; KAUSHIK, N. K. Short-Term Exposure of Zooplankton to the Synthetic Pyrethroid, Fenvalerate, and Its Effects on Rates of Filtration and Assimilation of the Alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 16, n. 4, p. 423–432, jul. 1987.

DE COEN, W. M.; JANSSEN, C. The Use of Biomarkers in *Daphnia magna* Toxicity Testing, I: The Digestive Physiology of Daphnids Exposed to Toxic Stress. **Hydrobiologia**, v. 367, p. 199–209, 1998.

DECAESTECKER, E.; DE MEESTER, L.; MERGEAY, J. **Cyclical Parthenogenesis in Daphnia: Sexual Versus Asexual Reproduction**. In: SCHÖN, I.; MARTENS, K.; DIJK, P. (Ed.). *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. p. 295–316.

DODSON, S. I.; HANAZATO, T. Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. Suppl 4, p. 7–11, maio 1995.

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

ESTEVES, F. de A. **Fundamentos de Limnologia**. Edição: 3ª ed. [s.l.] Interciência, 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil**. EFSA Scientific Report, 2006. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/rn-65>. Acesso em: 28 maio. 2020.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2,4-D**. EFSA 2014. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3812>>. Acesso em: 28 maio. 2020.

FAIRCHILD, J. F.; LA POINT, T. W.; SCHWARTZ, T. R. Effects of an Herbicide and Insecticide Mixture in Aquatic Mesocosms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 527–533, 1 nov. 1994.

FERNÁNDEZ-CASALDERREY, A.; FERRANDO, M. D.; ANDREU-MOLINER, E. Effects of Endosulfan on Survival, Growth and Reproduction of *Daphnia magna*.

**Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 106, n. 2, p. 437–441, 1 out. 1993.

FERNANDEZCASALDERREY, A.; FERRANDO, M. D.; ANDREUMOLINER, E. Effect of Sublethal Concentrations of Pesticides on the Feeding Behavior of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 27, n. 1, p. 82–89, 1 fev. 1994.

FERRANDO, M.; SANCHO, E.; ANDREU-MOLINER, E. Effects of lindane on *Daphnia magna* during chronic exposure. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 30, n. 6, p. 815–825, 1 jan. 1995.

FERREIRA, A. L. G.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M. Toxicity Prediction of Binary Combinations of Cadmium, Carbendazim and Low Dissolved Oxygen on *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology** (Amsterdam, Netherlands), v. 89, n. 1, p. 28–39, 11 ago. 2008.

FERREIRA, L.F.R., M.M. AGUIAR, T.G. MESSIAS, G.B. POMPEU, A.M.Q. LOPEZ, D.P. SILVA, AND R.T. MONTEIRO. 2011. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 74: 132–7.

FOCHTMAN, P.; RASZKA, A.; NIERZEDSKA, E. The Use of Conventional Bioassays, Microbiotests, and Some “Rapid” Methods in the Selection of an Optimal Test Battery for the Assessment of Pesticides Toxicity. **Environmental Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 376–384, 2000.

FOIT, K.; KASKE, O.; LIESS, M. Competition Increases Toxicant Sensitivity and Delays the Recovery of Two Interacting Populations. **Aquatic Toxicology**, v. 106–107, p. 25–31, 15 jan. 2012.

FONSECA, A.; ROCHA, A. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 16, 1 jan. 2004.

FORBES, V. E. Is Hormesis an Evolutionary Expectation? **Functional Ecology**, v. 14, n. 1, p. 12–24, 2000.

GAZONATO NETO, A. J. et al. Freshwater Neotropical Oligochaetes as Native Test Species for the Toxicity Evaluation of Cadmium, Mercury and Their Mixtures. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 2, p. 133–142, 1 mar. 2019.

GEORGE, J. P.; HINGORANI, H. G.; RAO, K. S. Herbicide toxicity to fish-food organisms. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, v. 28, n. 3, p. 183–188, 1 jul. 1982.

GHAZY, M. M. E.-D.; HABASHY, M. M.; MOHAMMADY, E. Y. Effects of pH on Survival, Growth and Reproduction Rates of The Crustacean, *Daphnia magna*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 5(11): 1-10, 2011.

GOLOMBIESKI, J. I. et al. Cladocera, Copepods and Rotifers in rice-fish culture handled with metsulfuron-methyl and azimsulfuron herbicides and carbofuran insecticide. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2097–2102, nov. 2008.

GOTTARDI, M. et al. The effects of epoxiconazole and A-cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction, and offspring size. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 2155–2166, 2017.

HANAZATO, T. Pesticides as Chemical Agents Inducing Helmet Formation in *Daphnia ambigua*. **Freshwater Biology**, v. 26, n. 3, p. 419–424, dez. 1991.

HANSON, M. L. et al. Influence of Isolation on the Recovery of Pond Mesocosms from the Application of an Insecticide. I. Study Design and Planktonic Community Responses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 1265–1279, jun. 2007.

HASSOLD, E.; BACKHAUS, T. The Predictability of Mixture Toxicity of Demethylase Inhibiting Fungicides to *Daphnia magna* Depends on Life-Cycle Parameters. **Aquatic Toxicology** (Amsterdam, Netherlands), v. 152, p. 205–214, jul. 2014.

HAYASAKA, D. et al. Differences in Ecological Impacts of Systemic Insecticides with Different Physicochemical Properties on Biocenosis of Experimental Paddy Fields. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 1, p. 191–201, 1 jan. 2012a.

HAYASAKA, D. et al. Differences in Susceptibility of Five Cladoceran Species to Two Systemic Insecticides, Imidacloprid and Fipronil. **Ecotoxicology** (London, England), v. 21, n. 2, p. 421–427, mar. 2012b.

HAYASAKA, D. et al. Cumulative Ecological Impacts of Two Successive Annual Treatments of Imidacloprid and Fipronil on Aquatic Communities of Paddy Mesocosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 355–362, 1 jun. 2012c.

JACONETTI, P. C. M. **Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones - *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii***. 2005. IPEN, São Paulo, 2005.

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/SETAC**, v. 24, n. 10, p. 2701–2713, out. 2005.

KEY, P. et al. Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, n. 2, p. 272–277, 1 out. 2007.

KHAN, Q.; KHAN, M. **Effect of temperature on waterflea *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera)**. Biological sciences, University of Illinois at Chicago, 2008.

KONWICK, B. J. et al. Acute Enantioselective Toxicity of Fipronil and Its Desulfinyl Photoproduct to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 2350–2355, 2005.

KWOK, K. W. et al. Comparison of Tropical and Temperate Freshwater Animal Species' Acute Sensitivities to Chemicals: Implications for Deriving Safe Extrapolation Factors. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 3, n. 1, p. 49–67, 2007.

LAJMANOVICH, R. C. et al. Individual and Mixture Toxicity of Commercial Formulations Containing Glyphosate, Metsulfuron-Methyl, Bispyribac-Sodium, and Picloram

on *Rhinella Arenarum* Tadpoles. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, n. 3, p. 1404, 17 fev. 2013.

LAMEIRA, V. **Estudo dos efeitos ecotoxicológicos dos fármacos paracetamol e dipirona sódica para organismos aquáticos**. 2012. Universidade de São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-06032013-141130/>>. Acesso em: 15 ago. 2020.

LEVCHENKO, M. A.; SILIVANOVA, E. A. Synergistic and Antagonistic Effects of Insecticide Binary Mixtures against House Flies (*Musca domestica*). **Regulatory Mechanisms in Biosystems**, v. 10, n. 1, p. 75–82, 22 fev. 2019.

LIESS, M. Population Response to Toxicants Is Altered by Intraspecific Interaction. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 138–142, 2002.

LIESS, M.; BEKETOV, M. Traits and stress: keys to identify community effects of low levels of toxicants in test systems. **Ecotoxicology** (London, England), v. 20, n. 6, p. 1328–1340, ago. 2011.

LIESS, M.; FOIT, K. Intraspecific Competition Delays Recovery of Population Structure. **Aquatic Toxicology**, v. 97, n. 1, p. 15–22, 1 abr. 2010.

LIESS, M.; PIETERS, B. J.; DUQUESNE, S. Long-Term Signal of Population Disturbance after Pulse Exposure to an Insecticide: Rapid Recovery of Abundance, Persistent Alteration of Structure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1326–1331, maio 2006.

LIZOTTE, R. E. et al. Effects of an Atrazine, Metolachlor and Fipronil Mixture on *Hyaella azteca* (Saussure) in a Modified Backwater Wetland. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 6, p. 836, 22 ago. 2009.

LOPES, I. et al. In Situ Assays with Tropical Cladocerans to Evaluate Edge-of-Field Pesticide Runoff Toxicity. **Chemosphere**, v. 67, n. 11, p. 2250–2256, 1 maio 2007.

LOPES, I. et al. Suitability of Five Cladoceran Species from Mexico for in Situ Experimentation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 111–116, 1 jan. 2011.

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.

LU, G.; LI, Z.; LIU, J. Effects of selected pharmaceuticals on growth, reproduction and feeding of *Daphnia magna*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 22, p. 2583–2589, 1 jan. 2013.

MALTBY, L. **Stress, shredders and streams: Using Gammarus energetics to assess water quality**. p. 98–110, 1994.

MANSANO, A. S. et al. Acute and Chronic Toxicity of Diuron and Carbofuran to the Neotropical Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 14, p. 13335–13346, maio 2018.

MARCHESAN, E. et al. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053–1059, maio 2010.

MARINHO, M. da C. et al. Assessment of *Rhodopirellula rubra* as a Supplementary and Nutritional Food Source to the Microcrustacean *Daphnia magna*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 8, p. 1231–1243, 1 ago. 2019.

MARTINEZ-TABCHE, L.; MADRIGAL-BUJAI DAR, E.; NEGRETE, T. Genotoxicity and Lipoperoxidation Produced by Paraquat and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in the Gills of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mikiss*). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 2004. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300953192>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

MATSUMOTO, K. et al. Toxicity of Agricultural Chemicals in *Daphnia magna*. **Osaka City Medical Journal**, v. 55, n. 2, p. 89–97, dez. 2009.

MCCARTY, L. S.; BORGERT, C. J. Review of the Toxicity of Chemical Mixtures: Theory, Policy, and Regulatory Practice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 119–143, 1 jul. 2006.

MCWILLIAM, R. A.; BAIRD, D. J. Postexposure Feeding Depression: New Toxicity Endpoint for Use in Laboratory Studies with *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1198–1205, jun. 2002.

MENDES, L. B. **O uso de modelos ecossistêmicos e experimentos laboratoriais para avaliação dos efeitos do agrotóxico Mythos® (i.e. pyrimethanil) em ecossistemas aquáticos**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-18022016-130207/>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

MENEZES, C. et al. The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): A metabolic and endocrine approach. **Aquaculture**, v. 435, p. 257–264, 1 jan. 2015.

MERGEAY, J. et al. *Daphnia* Community Analysis in Shallow Kenyan Lakes and Ponds Using Dormant Eggs in Surface Sediments. **Freshwater Biology**, v. 51, n. 3, p. 399–411, 2006.

MILAM, C. D. et al. Acute Toxicity of Six Freshwater Mussel Species (Glochidia) to Six Chemicals: Implications for *Daphnia* and *Utterbackia Imbecillis* as Surrogates for Protection of Freshwater Mussels (Unionidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 166–173, fev. 2005.

MOREIRA, R. A. et al. A Comparative Study of the Acute Toxicity of the Herbicide Atrazine to Cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 1, p. 1–8, mar. 2014.

MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of Abamectin and Difenconazole Mixtures to a Neotropical Cladoceran after Simulated Run-off and Spray Drift Exposure. **Aquatic Toxicology** (Amsterdam, Netherlands), v. 185, p. 58–66, abr. 2017.

MOTA, V. T.; ARAÚJO, T. A.; AMARAL, M. C. S. Comparison of Aerobic and Anaerobic Biodegradation of Sugarcane Vinasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 5, p. 1402–1412, jul. 2015.

MU, X.; LEBLANC, G. A. Synergistic Interaction of Endocrine-Disrupting Chemicals: Model Development Using an Ecdysone Receptor Antagonist and a Hormone Synthesis Inhibitor. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 1085–1091, abr. 2004.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; JR, C. R. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, n. 0, 2006. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/7483>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

NEBEKER, A. V. et al. Effects of Low Dissolved Oxygen on Survival, Growth and Reproduction of *Daphnia*, *Hyalella* and *Gammarus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 373–379, 1992.

NELSON, S. M.; ROLINE, R. A. Evaluation of the Sensitivity of Rapid Toxicity Tests Relative to Daphnid Acute Lethality Tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 292–299, 1 fev. 1998.

NORBERG-KING, T. **Toxicity Reduction and Toxicity Identification Evaluations for Effluents, Ambient Waters, and Other Aqueous Media**. SETAC, 2005.

OLIVEIRA, L. L. D. 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 mar. 2018.

OLIVEIRA NETO, A. L.; BOTTA-PASCHOAL, C. M. Sensibilidade do Cladocera lacustre planctônico *Ceriodaphnia silvestrii* (Família Daphnidae) aos metais cádmio, cromo e chumbo. In: **Ecotoxicologia: Perspectivas para o século XXI**. RiMa Editora, 2020. 1p. 537–544.

ORIS, J. T.; WINNER, R. W.; MOORE, M. V. A Four-Day Survival and Reproduction Toxicity Test for *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 217–224, 1 fev. 1991.

ORUC, E. O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-Specific Oxidative Stress Responses in Fish Exposed to 2,4-D and Azinphosmethyl. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 137, n. 1, p. 43–51, jan. 2004.

PAKRASHI, S. et al. *Ceriodaphnia dubia* as a Potential Bio-Indicator for Assessing Acute Aluminum Oxide Nanoparticle Toxicity in Fresh Water Environment. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74003, 5 set. 2013.

PAVLAKI, M. D. et al. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna* - **ScienceDirect**. v. 74, n. 1, p. 99–110, 2011.

PAZ-PINO, O. L.; BARBA-HO, L. E.; MARRIAGA-CABRALES, N. Vinasse treatment by coupling of electro-dissolution, hetero-coagulation and anaerobic digestion. **DYNA**, v. 81, n. 187, p. 102–107, out. 2014.



PENTTINEN, S.; KOSTAMO, A.; KUKKONEN, J. V. K. Combined effects of dissolved organic material and water hardness on toxicity of cadmium to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 2498–2503, 1 dez. 1998.

PEREIRA, A. S.; CEREJEIRA, M. J.; DAAM, M. A. Toxicity of Environmentally Realistic Concentrations of Chlorpyrifos and Terbutylazine in Indoor Microcosms. **Chemosphere**, v. 182, p. 348–355, set. 2017.

PEREIRA, J. L.; MENDES, C. D.; GONÇALVES, F. Short- and Long-Term Responses of *Daphnia* Spp. to Propanil Exposures in Distinct Food Supply Scenarios. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, n. 3, p. 386–396, 1 nov. 2007.

PHAM, T.-L.; BUI, H. M. **Comparison of Diazinon Toxicity to Temperate and Tropical Freshwater *Daphnia* Species**. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jchem/2018/9217815/>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

PINTO, T. J. da S. **Impactos do inseticida fipronil e do herbicida 2,4-D (isolados e em misturas) sobre macroinvertebrados aquáticos bentônicos Neotropicais**. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

PRÉSING, M. On the Effects of Dikonirt (Sodium Salt of 2.4-Dichlorophenoxy-Acetic Acid) on the Mortality and Reproduction of *Daphnia magna*. **Hydrobiologia**, v. 83, n. 3, p. 511–516, 1 set. 1981.

RAJINI, A.; REVATHY, K.; CHITRIKHA, T. Toxicity and Reproductive Effect of Combination Pesticide to *Daphnia magna*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 9 (3), n. 3, 2016.

RATUSHNYAK, A.; ANDREEVA, M. G.; TRUSHIN, M. V. Effects of Type II Pyrethroids on *Daphnia magna*: Dose and Temperature Dependences. **Rivista Di Biologia**, v. 98, n. 2, p. 349–357, ago. 2005.

RELYEA, R. A. A Cocktail of Contaminants: How Mixtures of Pesticides at Low Concentrations Affect Aquatic Communities. **Oecologia**, v. 159, n. 2, p. 363–376, 1 mar. 2009.

ROBLES-VARGAS, D. Toxicity of Agrochemicals on Freshwater Invertebrates — A Short Review. **Toxicity and Hazard of Agrochemicals**, 22 jul. 2015. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/toxicity-and-hazard-of-agrochemicals/toxicity-of-agrochemicals-on-freshwater-invertebrates-a-short-review>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

ROCHA, O.; GUNTZEL, A. M. Crustacea Branchiopoda. In: **Invertebrados de água doce**. São Paulo: Biota/Fapesp, 2000. 4p. 109–120.

ROCHA, O.; SANTOS-WISNIEWSKI, M. J.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Checklist de Cladocera de água doce do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 571–592, dez. 2011.

ROHR, J. R.; CRUMRINE, P. W. Effects of an Herbicide and an Insecticide on Pond Community Structure and Processes. **Ecological Applications**, v. 15, n. 4, p. 1135–1147, 2005.

ROMANHOLO FERREIRA, L. F. et al. Evaluation of Sugar-Cane Vinasse Treated with *Pleurotus Sajor-Caju* Utilizing Aquatic Organisms as Toxicological Indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132–137, 1 jan. 2011.

SÁNCHEZ, M.; ANDREU-MOLINER, E.; FERRANDO, M. D. Laboratory Investigation into the Development of Resistance of *Daphnia magna* to the Herbicide Molinate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 3, p. 316–323, 1 nov. 2004.

SANCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R. V. Comparison of Environmental Risks of Pesticides between Tropical and Nontropical Regions. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 577–586, 2011.

SANCHO, E. et al. Impaired Reproduction and Individual Growth of the Water Flea *Daphnia magna* as Consequence of Exposure to the Non-Ester Pyrethroid Etofenprox. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 7, p. 6209–6217, 1 mar. 2018.

SANDERS, H. O. Toxicities of Some Herbicides to Six Species of Freshwater Crustaceans. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, v. 42, n. 8, p. 1544–1550, 1970.

SANTOS, V. S. dos. **O que é o zooplâncton?** Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/biologia/o-que-zooplancton.htm>>. Acesso em: 14 ago. 2020.

SCHMIDT, K.; STEINBERG, C. E. W.; STAAKS, G. B. O. Influence of a Xenobiotic Mixture (PCB and TBT) Compared to Single Substances on Swimming Behavior or Reproduction of *Daphnia magna*. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, v. 33, n. 4, p. 287–300, 2005.

SHAHID, N.; LIESS, M.; KNILLMANN, S. Environmental Stress Increases Synergistic Effects of Pesticide Mixtures on *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 21, p. 12586–12593, 5 nov. 2019.

SILVA, L. C. M. da. **Efeito da aclimação termal sobre a sensibilidade e toxicidade termo-dependente ao Glifosato para *Ceriodaphnia silvestrii***. 2017. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-09032017-142632/pt-br.php>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

SILVA, L. C. M.; DAAM, M. A.; GUSMAO, F. Acclimation Alters Glyphosate Temperature-Dependent Toxicity: Implications for Risk Assessment under Climate Change. **Journal of Hazardous Materials**, v. 385, p. 121512, 5 mar. 2020.

SMIT, E.; VONK, J. **Environmental risk limits for fenoxycarb**, 2008.

SOUCEK, D. J. Bioenergetic Effects of Sodium Sulfate on the Freshwater Crustacean, *Ceriodaphnia dubia*. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 3, p. 317–325, 1 abr. 2007.

SPADOTO, M. et al. Ecotoxicological Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on the Freshwater Cladocerans *Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia similis*. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 4, p. 449–458, out. 2018.

STARK, J. D.; VARGAS, R. I. Toxicity and Hazard Assessment of Fipronil to *Daphnia pulex*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 1, p. 11–16, set. 2005.

STATSOFT INC. 2004. Statistica: data analysis software system, version 7. Tulsa. Available at: <<http://www.statsoft.com/>>.

TAILLEBOIS, E.; THANY, S. H. The Differential Effect of Low-Dose Mixtures of Four Pesticides on the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Insects**, v. 7, n. 4, 12 out. 2016.

TAYLOR, G.; BAIRD, D. J.; SOARES, A. M. V. M. Surface Binding of Contaminants by Algae: Consequences for Lethal Toxicity and Feeding to *Daphnia magna* Straus. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 412–419, 1998.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1189–1197, ago. 2003.

US EPA, U. S. E. P. A. **Pesticide Ecotoxicity Database** (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)) Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C, 1992.

US EPA, U. S. E. P. A. **ECOTOX Knowledgebase**, 2020. Disponível em: <<https://cfpub.epa.gov/ecotox/search.cfm>>.

VELÁSQUEZ-RIAÑO, M.; MENESES-SÁNCHEZ, J. S.; CARVAJAL ARIAS, C. E. Evaluation of acute toxicity of vinasse by means of *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*: a comparative study. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 12, n. 3, p. 143–148, nov. 2019.

VERSTEEG, D. J. et al. Ceriodaphnia and daphnia: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. **Chemosphere**, v. 34, n. 4, p. 869–892, 1 fev. 1997.

VIJVERBERG, J.; KALF, D. F.; BOERSMA, M. Decrease in Daphnia Egg Viability at Elevated PH. **Limnology and Oceanography**, v. 41, n. 4, p. 789–794, 1996.

VILAR, D. S. et al. Vinasse Degradation Using Pleurotus Sajor-Caju in a Combined Biological – Electrochemical Oxidation Treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 192, p. 287–296, 9 fev. 2018.

VILLARROEL, M. J. et al. *Daphnia magna* Feeding Behavior after Exposure to Tetradifon and Recovery from Intoxication. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, n. 1, p. 40–46, 1 set. 1999.

WANG, Z.; KWOK, K. W.; LEUNG, K. M. Comparison of Temperate and Tropical Freshwater Species' Acute Sensitivities to Chemicals: An Update. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 9 jan. 2019.

WILLMING, M. M.; QIN, G.; MAUL, J. D. Effects of Environmentally Realistic Daily Temperature Variation on Pesticide Toxicity to Aquatic Invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 12, p. 2738–2745, 2013.

WILSON, W. A. et al. Enantioselective Chronic Toxicity of Fipronil to *Ceriodaphnia dubia*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 36–43, jan. 2008.

WIRTH, E. F. et al. The Effects of the Contemporary-Use Insecticide (Fipronil) in an Estuarine Mesocosm. **Environmental Pollution**, v. 131, n. 3, p. 365–371, 1 out. 2004.

WOODS, M.; KUMAR, A.; CORRELL, R. Acute Toxicity of Mixtures of Chlorpyrifos, Profenofos, and Endosulfan to *Ceriodaphnia dubia*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, n. 6, p. 801–808, 1 jun. 2002.

XIE, L. et al. Evaluation of Estrogenic Activities of Aquatic Herbicides and Surfactants Using an Rainbow Trout Vitellogenin Assay. **Toxicological Sciences**, v. 87, n. 2, p. 391–398, 1 out. 2005.

## 7. CAPÍTULO III – Ensaio de toxicidade com *Danio rerio*

### 7.1. Introdução

Os peixes constituem o grupo de vertebrados com o maior número de espécies existente, com aproximadamente 35 mil espécies que habitam os diferentes sistemas aquáticos presentes em todo mundo (FROESE; PAULY, 2022). Estes organismos são ectotérmicos, ou seja, a temperatura corporal varia conforme o ambiente, possuem brânquias e as utilizam para a realização da troca gasosa com o ambiente, locomovem-se por natação através das nadadeiras e a maior parte das espécies possui escamas (BEMVENUTI; FISCHER, 2010). Os peixes possuem uma gigantesca diversidade de formas, cores e tipos de locomoção, variando de pequenas espécies com oito milímetros de comprimento, como *Paedocypris progenetica*, até grandes espécies como o tubarão-baleia *Rhincodon typus*, que pode chegar a 18 metros e é considerado o maior vertebrado não mamífero do mundo (BOELTER, 2022). Devido a essa grande diversidade ecológica, os peixes possuem uma ampla variedade de hábitos alimentares, com representantes na maior parte dos grupos da cadeia trófica aquática (GERKING, 1994).

Além da importância ecológica para o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, os peixes possuem um alto valor econômico através da piscicultura. Em 2020, por exemplo, a receita gerada pela pesca brasileira foi de cerca de R\$ 8 bilhões de reais, com aproximadamente 1 milhão de empregos diretos e indiretos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, 2022). Relacionado a isso, os peixes fazem parte da alimentação da população global, representando 17 % da ingestão de proteínas animais (FAO, 2020), sendo imprescindível na subsistência das comunidades de pescadores.

Os peixes também são importantes na investigação científica, como na bioprospecção de moléculas para serem utilizadas em medicamentos (ANDERSEN et al., 2000), modelo animal para pesquisa de vacinas para humanos e animais (BAILONE et al., 2020) e são ferramentas importantes na ecotoxicologia através da avaliação de toxicidade e monitoramento da qualidade da água de sistemas aquáticos de todo o mundo. Como estes animais ocupam diferentes posições na cadeia trófica, tem sistemas osmorregulatórios, endócrinos, nervosos e imunológicos bem desenvolvidos, são de fácil amostragem e cultivo, além de serem parte da alimentação humana, são bons bioindicadores de contaminação de sistemas aquáticos devido à alta sensibilidade e capacidade de absorverem diretamente substâncias tóxicas (YANCHEVA et al., 2015). Dentre as espécies de peixes utilizadas em ecotoxicologia, uma das mais

estudadas, com cerca de 40 mil dados incluídos na base de dados da US EPA (US EPA, 2022), é o peixe tropical teleósteo *Danio rerio*, popularmente conhecido como peixe zebra ou paulistinha.

**Figura 34.** Peixe tropical *Danio rerio*



**Fonte:** Laís C. M. da Silva (2019)

*Danio rerio* é uma espécie de pequenos peixes, com aproximadamente quatro centímetros de comprimento. São peixes tropicais originários do sul da Ásia e com ocorrência registrada em uma variedade de habitats aquáticos, como canais de irrigação e campos de arroz, tanques de peixes artificiais, trechos superiores de rios e até mesmo riachos de colinas de fluxo rápido (MENON, 1999). Estes pequenos peixes vivem em cardumes entre 5 e 20 indivíduos e a reprodução é realizada com o depósito dos ovos sobre um substrato e sem cuidado parental (PRITCHARD et al., 2001). É pressuposto que possuem ciclo de vida útil de um ano e são peixes generalistas, alimentando-se de uma variedade de crustáceos bentônicos e planctônicos, vermes e larvas de insetos (SPENCE et al., 2006).

A partir de uma seleção de atributos, como tamanho, rápido desenvolvimento e tempo entre gerações, transparência óptica durante o desenvolvimento inicial, fácil cultivo, menor espaço demandado em comparação com outros peixes, além de semelhança genética com humanos, *D. rerio* representa um modelo ideal para estudos de comportamento animal, fisiologia e ecotoxicologia aquática (LAWRENCE, 2007). E apesar de não ser uma espécie nativa do Brasil é certamente uma das espécies mais estudadas no país (KRULL; BARROS, 2012).

Neste sentido, com o intuito de avaliar as consequências da contaminação ambiental provocada pela atividade sucroalcooleira em um organismo representante do grupo dos consumidores da cadeia trófica aquática; este capítulo teve por objetivo avaliar a toxicidade dos agrotóxicos DMA<sup>®</sup> (i.a. 2,4-D) e Regent<sup>®</sup> (i.a. fipronil) e da vinhaça da cana-de-açúcar, isolados e em mistura, sobre o peixe tropical *D. rerio* a partir de abordagens letais, subletais e de pós-exposição. Este objetivo, além de criar informações inéditas através da avaliação destes

compostos em mesocosmos, complementa informações anteriores reforçando a importância de controlar o uso deles com a intenção de preservar os ecossistemas naturais em um cenário de expansão agrícola.

## 7.2. Material e Métodos

### 7.2.1. Organismo-teste e condições da aclimação

Exemplares adultos de *Danio rerio* foram obtidos de estabelecimento comercial especializado no cultivo de peixes e transportados para o Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA/CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo (EESC/USP), localizado no município de Itirapina, Brasil (22°01'22" S, 43°57'38" W), onde foram realizados os estudos ecotoxicológicos com a espécie. Todos os procedimentos realizados no presente capítulo tiveram autorização da Comissão de Ética em Utilização de Animais da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP), conforme parecer nº 01/2019 (ANEXO 1).

Inicialmente, os animais foram aclimatados durante sete dias em água de poço natural, com pH 6.0 – 7.0, dureza 12-16 mgCaCO<sub>3</sub>/L e oxigênio dissolvido > 6,0 mgO<sub>2</sub>/L, em aquários com capacidade de 90 litros e aeração constante, em sala aclimatizada com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h/12h claro/escuro. Os peixes foram alimentados diariamente com ração de peixe Tetramin<sup>®</sup> e até 24 horas antes de cada teste de toxicidade. Em cada lote de organismos recebidos para a realização dos testes, seguindo as recomendações da norma NBR 15088 (ABNT, 2016), foi realizada biometria de 10 % dos organismos com auxílio de uma balança de precisão e uma régua milimetrada.

Testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio (KCl) foram executados para verificar as condições fisiológicas dos peixes antes dos testes de toxicidade. As concentrações utilizadas em cada teste de sensibilidade foram 0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5 mg/L de KCl. Cada concentração teve 10 peixes adultos (machos e fêmeas) divididos em três réplicas (3, 3, 4) com 1 litro de solução cada, respeitando a proporção de 1g de peixe por litro de solução-teste. Os testes de sensibilidade tiveram duração de 48 horas e o *endpoint* foi a letalidade, com o cálculo da CL<sub>50-48</sub> horas (concentração letal para 50 % dos organismos). Todos os procedimentos seguiram as recomendações da norma NBR 15088 (ABNT, 2016).

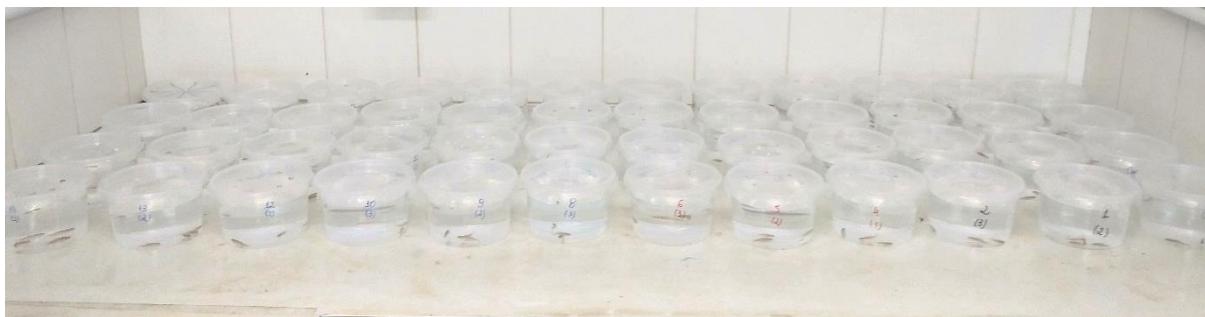
### 7.2.2. Testes de toxicidade com os agrotóxicos em laboratório

Primeiramente, testes de toxicidade aguda isolados com os agrotóxicos DMA<sup>®</sup> 806 BR e Regent<sup>®</sup> 800 WG foram realizados a fim de obter os valores de CL<sub>50</sub>-96 horas para cada produto formulado. Para isso, a partir de testes preliminares foram definidas cinco concentrações nominais de cada substância, sendo: 0; 1; 10; 100; 250; 500 e 1000 mg/L de 2,4-D e 0; 100; 150; 200; 250 e 350 µg/L de fipronil. Cada uma das concentrações continha 10 peixes, distribuídos em três réplicas, respeitando a proporção 1 g/L. O lote dos peixes para os experimentos realizados nesta etapa teve uma média de peso de  $0,28 \pm 0,04$  g e tamanho de  $3,08 \pm 0,20$  cm. Os testes foram realizados em potes plásticos atóxicos com tampa perfurada e capacidade para 1 litro de solução-teste (Figura 35). Em cada teste, a mortalidade foi verificada a cada 24 horas e os peixes mortos foram retirados dos potes. Além disso, cada réplica recebeu aeração por um minuto por dia para garantir que os níveis de oxigênio dissolvido permanecessem maiores que 6 mgO<sub>2</sub>/L. Cada teste teve duração de 96 horas e foram realizados em sala climatizada com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12h/12h claro/escuro e sem alimentação. O *endpoint* foi a letalidade com a cálculo da CL<sub>50</sub>-96 horas.

Para o teste de mistura, foram selecionadas três concentrações de cada agrotóxico, sendo elas: 367, 1385 e 100000 µg/L para o herbicida e 100, 150 e 200 µg/L para o inseticida. No caso do herbicida, as duas primeiras concentrações foram baseadas em concentrações máximas reportadas no ambiente (CETESB, 2018) e em mesocosmos (Tabela 4), a última e as usadas com o inseticida foram retiradas do teste agudo com as formulações isoladas e também estão dentro da faixa de concentrações reportadas no ambiente (CETESB, 2018). As combinações binárias das concentrações utilizadas são mostradas na Tabela 14. Todos os procedimentos realizados durante o teste foram os mesmos descritos para os testes isolados. Ainda, neste teste, foram avaliados também os organismos debilitados (alterações no padrão natatório ou imobilidade) e posterior cálculo de CE<sub>50</sub>-96 horas.

Ao final do teste, os organismos debilitados sobreviventes foram retirados do meio contaminado e retornaram às condições de cultivo durante um período de sete dias para verificar se os danos comportamentais causados pela exposição aos contaminantes seriam permanentes.



**Figura 35.** Experimento de mistura de agrotóxicos com *D. rerio*

Fonte: Laís C. M. da Silva (2019)

**Tabela 14.** Concentrações utilizadas no teste de mistura com *D. rerio*. F (fipronil), D (2,4-D) e M (mistura)

Tratamento	Concentrações ( $\mu\text{g/L}$ )	
	Regent <sup>®</sup> 800 WG	DMA <sup>®</sup> 806 BR
Controle	0	0
F1	100	0
F2	150	0
F3	200	0
D1	0	367
D2	0	1385
D3	0	100000
M1	100	367
M2	100	1385
M3	100	100000
M4	150	367
M5	150	1385
M6	150	100000
M7	200	367
M8	200	1385
M9	200	100000

### 7.2.3. Testes de toxicidade in situ em mesocosmos

Os procedimentos dos experimentos com *D. rerio* em mesocosmos foram baseados na metodologia utilizada por Mendes (2015) e Sanches (2018). Três dias antes da contaminação dos mesocosmos, os primeiros peixes foram inseridos em câmaras-teste (volume de

aproximadamente um litro) e alocados cerca de 20 cm da superfície (Figura 36). As câmaras foram fabricadas com tubos de PVC, com aberturas nas laterais e revestidas com telas de poliéster com aberturas de 500  $\mu\text{m}$ , permitindo a passagem de alimento para os peixes e garantindo que eles permanecessem nas mesmas. Assim como nos testes em laboratório, cada mesocosmo continha 10 peixes distribuídos em três câmaras com uma média de tamanho e peso de  $3,68 \pm 0,13$  cm e  $0,41 \pm 0,01$  g, respectivamente. A duração de cada teste foi de 96 horas, ocorrendo em T1 (logo depois da contaminação), T3 (7 dias), T4 (14 dias) e T5 (21 dias), tendo como *endpoint* a letalidade.

**Figura 36.** Câmara-teste de *D. rerio* inserida em mesocosmos



**Fonte:** Allan Pretti Ogura (2018)

#### 7.2.4. Avaliações pós-exposição em mesocosmos

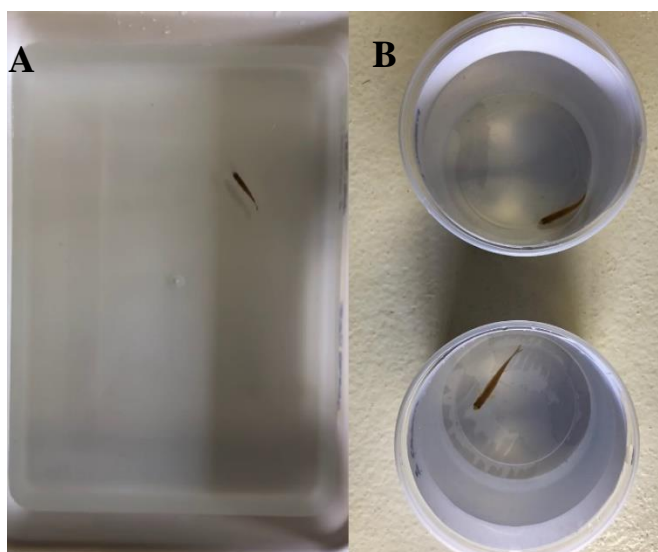
Após os testes de toxicidade em mesocosmos, os organismos sobreviventes de cada tratamento foram retirados das câmaras, levados para o laboratório e separados em dois grupos. Um grupo foi submetido ao teste de comportamento natatório e o segundo ao teste de alimentação.

Os testes de comportamento natatório seguiram a metodologia descrita em Moreira et al. (2019). Três organismos de cada tratamento foram escolhidos aleatoriamente para esta análise. Individualmente, os peixes foram inseridos em recipiente com água de cultivo (Figura 37A) e tiveram sua atividade natatória registrada em vídeo durante um minuto. Os vídeos foram analisados através do software Kinovea versão 0.8.26 (<https://www.kinovea.org/>). O software

foi calibrado tendo como base as medidas do recipiente utilizado para a análise e os parâmetros avaliados foram velocidade média (m/s) e a distância percorrida (cm).

No caso do teste de alimentação, os procedimentos utilizados foram fundamentados no método descrito por Abdel-Moneim et al. (2015). Assim como o teste de natação, três peixes de cada tratamento foram escolhidos aleatoriamente para este experimento. Cada peixe foi inserido em um recipiente com capacidade de 500 ml contendo água de cultivo (Figura 37B). Os recipientes foram envoltos com papel branco para isolar os peixes de fatores externos de estresse e estes permaneceram aclimatando por uma hora. Após isso, a avaliação consistiu no fornecimento de 10 indivíduos de *Ceriodaphnia silvestrii* em cinco períodos de alimentação (1.º, 3.º, 15.º, 45.º e 60.º minuto), totalizando uma hora de teste. No final de cada período o número de organismos era contabilizado e novamente 10 indivíduos de *C. silvestrii* eram adicionados. A taxa de alimentação foi estimada pelo número médio de cladóceros/peixe/hora.

**Figura 37.** *D. rerio* submetido aos testes de pós-exposição (A) comportamento natatório e (B) alimentação com *C. silvestrii*



**Fonte:** Laís C. M. da Silva (2018)

### 7.2.5. Histologia de brânquias

Concomitante às análises de pós-exposição, peixes sobreviventes dos experimentos de mesocosmos foram anestesiados em dose letal de benzocaína (2 mg/L). Após isso, os arcos branquiais foram retirados com o auxílio de um bisturi e fixados em solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4, por 24 horas e mantidas em glutaraldeído 0,5 % no mesmo tampão para as análises morfológicas.

Posteriormente, as brânquias foram lavadas em fosfato 0,1 M para a remoção do fixador em excesso e desidratadas em série crescente de etanol por quatro horas (70 a 100 %). Em seguida, as brânquias foram diafanizadas em xilol durante uma hora e incluídas em paraplast® (Sigma Aldrich). Após, cortes de 5 µm de espessura foram feitos em sequência semi-serial (1 corte: descarte de 10 µm) em micrótomo automático (Thermo Scientific Microm, HM-360) utilizando facas descartáveis. Os cortes histológicos foram corados com azul de toluidina seguindo o método descrito por Behmer e Tolosa (2003). Em cada corte, 10 campos de filamentos tiveram suas imagens digitais capturadas com o auxílio de um microscópio de luz (Olympus BX61, Olympus, EUA) com uma câmera de vídeo acoplada a um computador.

Para o cálculo do índice de alteração histopatológica (IAH), a frequência, o tipo e grau de gravidade de cada dano foram registrados e classificados fundamentados no método de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), com pequenas modificações como realizado em Viana et al. (2022). A frequência dos danos histológicos foi classificada assim como realizado em Paulino et al. (2014): 0, ausência de lesões (ausência de lesões ou lesões em até 10 % do tecido total analisado); 0+, raramente presente (ocorrência de lesões em 11 % a 25 % do tecido total analisado); +, presente (ocorrência de lesões em 26 % a 50 % do tecido analisado); ++, frequente (ocorrência de lesões de 51 % a 75 % do tecido analisado) e +++, lesões muito frequentes (ocorrência de lesões em 76 % a 100 % do tecido analisado).

#### **7.2.6. Análise estatística**

Os valores de CL e CE foram calculados através do software Statistica versão 7.0 (STATSOFT, 2004). Diferenças significativas entre os tratamentos no teste de mistura em laboratório dos dois agrotóxicos foram analisados com GLM (Generalized Linear Models) no programa R 3.6.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019). Para os testes em mesocosmos, assim como feito para *C. silvestrii*, uma ANOVA com design misto (*repeated measures ANOVA*) foi realizada relacionando o tempo (dia de coleta em relação a contaminação) como um fator dentro da amostragem (*within-subjects*). Com esfericidade pelo teste de Mauchly e correção de Greenhouse-Geisser para os graus de liberdade. As diferenças significativas entre os tratamentos e o tempo ( $p < 0,05$ ) foram observadas usando o teste post-hoc de Tukey HSD. A normalidade dos dados e homoscedasticidade, foram verificados através de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. No caso dos experimentos de alimentação e análise de danos histológicos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-

hoc de Dunn. As análises citadas foram realizadas no software Statistica versão 7.0 (STATSOFT, 2004).

### **7.3. Resultados e discussão**

#### **7.3.1. Testes de sensibilidade**

O valor de médio de  $CL_{50-48h}$  dos testes de sensibilidade de KCl foi de 657,24 mg/L com intervalo de confiança (IC 95 %) entre 616,82 e 755,75 mg/L. Este resultado está dentro dos limites inferiores e superiores (500 – 1500 mg/L) obtidos nos outros experimentos de Sanches (2018), no mesmo laboratório  $CL_{50-48h}$  foi de 1000 mg/L). Resultados obtidos por Mendes (2015) e Novelli et al. (2012) estão ainda mais próximos do presente estudo ( $CL_{50-48h}$  de 758,15 e 763,5 mg/L, respectivamente). Os limites de confiança inferiores e superiores para estes dois estudos foram de 733,15 e 782,08 mg/L em Mendes (2015) e 544 e 919 mg/L em Novelli et al. (2012). Sendo assim, os resultados estão dentro da faixa de sensibilidade, dentro do mesmo laboratório, o que segundo a norma para a espécie (ABNT, 2016) valida os testes realizados.

#### **7.3.2. Testes de toxicidade com os agrotóxicos em laboratório**

A média dos valores de  $CL_{50-96}$  horas obtidos nos testes com as formulações isoladas foram de  $483 \pm 18$  mg/L para DMA<sup>®</sup> e  $172 \pm 30$  µg/L para Regent<sup>®</sup>. No caso dos valores de  $CL_{10-96}$  horas para o herbicida e o inseticida, estes foram de  $440 \pm 24$  mg/L e  $136 \pm 57$  µg/L, respectivamente.

No teste de mistura, as concentrações avaliadas isoladamente não causaram mortalidade em *Danio rerio*, no entanto Regent<sup>®</sup> provocou danos comportamentais em 53 % dos peixes expostos ao inseticida isoladamente, sendo que na última concentração esse valor chegou a 100 %. Neste sentido, calculou-se a concentração de efeito ( $CE_{50-96}$  horas) para os peixes debilitados, que apresentou um valor de 155 µg/L, com IC 95 % entre 154 e 204 µg/L. Estes danos comportamentais relacionam-se a imobilidade, dificuldade na natação, natação na superfície, dificuldades de equilíbrio e curvamento da coluna vertebral (Figura 37), que também ocorreram na mistura, com mortalidade apenas na última concentração (M9).

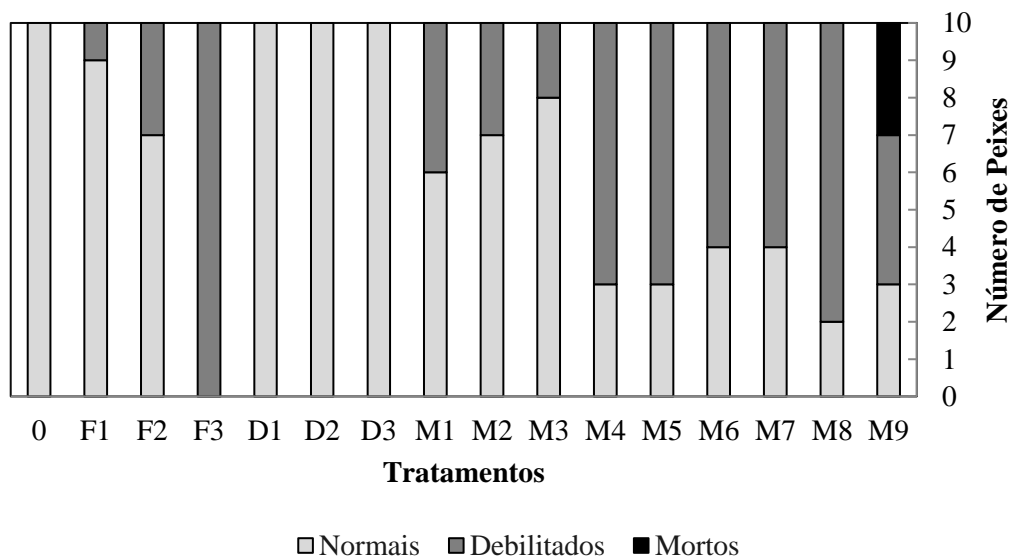
**Figura 38.** *D. rerio* com curvamento da coluna vertebral pós-exposição ao inseticida fipronil



**Fonte:** Laís C. M. da Silva (2018)

Na Figura 39 pode-se visualizar melhor a relação entre os peixes normais e debilitados no teste da mistura. Comparando os tratamentos de Regent<sup>®</sup> isolado e em mistura com DMA<sup>®</sup>, percebe-se que a mistura potencializou o número de organismos debilitados nas misturas com as concentrações de 100 e 150 µg/L (Figura 39). Já para a concentração de 200 µg/L, alguns peixes mantiveram-se normais, ao contrário do que ocorreu na exposição isolada. Por outro lado, três peixes morreram na última combinação. Estatisticamente, existem diferenças significativas com relação ao controle no último tratamento do inseticida (F3) e nas misturas, com exceção de M2 e M3 (GLM  $p < 0,05$ ). Com relação ao herbicida, apesar de DMA<sup>®</sup> não ter efeito agudo isolado, é evidente sua influência na avaliação da mistura, já que os resultados da mistura divergiram dos efeitos de fipronil isolado.

**Figura 39.** Relação entre peixes normais e debilitados na exposição à mistura de agrotóxicos



Na literatura, para 2,4-D, existem estudos que demonstram a influência negativa de 2,4-D em diferentes espécies de peixes (DA FONSECA et al., 2008; RUIZ DE ARCAUTE; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2016; DEHNERT et al., 2018), assim como para *D. rerio* (TON; LIN; WILLETT, 2006; Li et al., 2017; GAAIED et al., 2020; MARTINS et al., 2021).

A respeito dos testes agudos com *D. rerio*, tem-se como referência para comparação dos valores de CL<sub>50</sub>-96 h para *D. rerio* apenas o estudo de Benijts-claus e Persoone (1975) que obtiveram o resultado de 160 mg/L. No entanto, este valor foi obtido da base de dados da US EPA (2022) e como não foi possível o acesso ao arquivo original e a mesma informação está disponível também como CL<sub>50</sub>-48 h, este dado foi desconsiderado para fins comparativos. Com isso, até o momento, não há estudos com adultos para fins comparativos.

No caso dos embriões de *D. rerio*, os estudos de Ton et al. (2006), Martins et al. (2021) e Gaaied et al. (2020) avaliaram a letalidade de 2,4-D e obtiveram uma resposta muito mais sensível em comparação com os juvenis, com valores de CL<sub>50</sub>-96 h de 29,17; 15,01 e 2,86 mg/L de 2,4-D, respectivamente. Ton et al. (2006) também analisou o desenvolvimento anormal do embrião e determinou a CE<sub>50</sub>-96 h de 16,13 mg/L. Este mal desenvolvimento foi acompanhado de mudanças nas células cerebrais, com a menor concentração com efeito (LOEL, em inglês) de 11,05 mg/L e apoptose em 17,68 mg/L, sinalizando que apesar de não possuir mecanismo de ação neurotóxico, como fipronil, o herbicida 2,4-D tem potencial neurotóxico em vertebrados. Martins et al. (2021) também detectaram efeito subletais nos embriões, com a determinação de CEO (concentração de efeito observado) em 2,5 mg/L para alterações nas enzimas fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, que são marcadores de lesão hepatocelular. Além disso, Li et al. (2017) observaram edema pericárdio em grande parte dos embriões avaliados neste estudo, os quais estavam associados a desregulação de genes marcadores do desenvolvimento cardíaco e estresse oxidativo. O valor de CL<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub>-72 horas para sobrevivência e taxa de eclosão foram de 46,71 e 46,26 mg/L de 2,4-D, respectivamente. Gaaied et al. (2020) observaram o edema pericárdio em doses relevantes ambientalmente ( $\geq 320 \mu\text{g/L}$ ) na avaliação de um produto formulado (Désormone lourd), além de deformidades na cauda. Os autores também observaram efeitos significativos na atividade da colinesterase em todas as doses subletais testadas (20 a 800  $\mu\text{g/L}$ ). Esta enzima é essencial no desenvolvimento normal de peixes, que podem ter a atividade locomotora prejudicada se ocorrerem distúrbios em sua atividade (NOBONITA; SUCHISMITA, 2013).

Em resumo, os estudos realizados demonstram que os principais alvos de 2,4-D em *D. rerio* são os sistemas nervoso central, cardiovascular e hepático. E apesar da maior parte das avaliações utilizarem doses que estão muito acima das concentrações presentes no ambiente, por exemplo, de 143,1 a 366,6 µg/L na avaliação da CETESB (2018), alguns estudos já indicaram o potencial de bioacumulação de 2,4-D em *D. rerio* e outras espécies de peixes (DA FONSECA et al., 2008; LI et al., 2017; GAAIED et al., 2020). A acumulação e exposição à estas pequenas doses podem provocar efeitos crônicos a longo prazo que exposições agudas ou de poucos dias não são suficientes para detectar.

Para o inseticida fipronil, existem uma série de avaliações letais e subletais do seu potencial tóxico para diferentes espécies de peixes (NILLOS et al., 2009; BEGGEL et al., 2010; GUPTA et al., 2014). Os estudos com *D. rerio* seguem o mesmo sentido (WANG et al., 2016; DA COSTA CHAULET et al., 2019; MOREIRA et al., 2021). No caso do efeito letal, Wang et al. (2010) apresentaram um valor de  $CL_{50-96\text{ h}} = 181\text{ }\mu\text{g/L}$ , muito próximo da média obtida no presente trabalho. Wu et al. (2014), também calculou a concentração letal, e obteve  $CL_{50-24\text{ h}} = 220,4\text{ }\mu\text{g/L}$ .

Com relação aos efeitos subletais, pode-se citar efeitos genéticos (WANG et al. 2010), enzimáticos (WU et al. 2014), comportamentais (DA COSTA CHAULET et al., 2019), reprodutivos (ANCA; CRISTINA; GEORGESCU, 2013) e de crescimento (STEHR et al., 2006). Por exemplo, o produto formulado Regent<sup>®</sup>, utilizado no presente trabalho, inibiu a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em peixes adultos de *D. rerio* exposto às concentrações de 75 e 100 µg/L, o que pode representar efeito neurológico do inseticida na espécie-teste (MOREIRA et al., 2021). No caso de embriões, Stehr et al. (2006) observaram resposta motora prejudicada, degeneração da notocorda, morfologia anormal das fibras musculares e encurtamento do comprimento dos organismos. Os autores desse estudo sugeriram que fipronil prejudica o desenvolvimento das vias locomotoras espinhais inibindo receptores relacionados. Tanto este artigo quanto o de Chaulet et al. (2019), citam a possibilidade dos efeitos de fipronil sobre o neurotransmissor glicina ser o responsável por mudanças comportamentais de peixes expostos ao inseticida. Em outro estudo realizado com Regent<sup>®</sup>, Cuenca et al. (2022) notaram o encurtamento dos embriões de *D. rerio* em doses entre 400 e 1600 µg/L. Em doses menores, em adultos, houve alteração na glicemia dos organismos (20 µg/L) e diminuição na taxa de resistência de natação (entre 0,2 e 20 µg/L).



Wang et al. (2019) observaram, em um estudo metabolômico, que fipronil em baixas doses (entre 10 e 80 µg/L) induziram um comportamento ansioso em *D. rerio* associado a resultados de maior oxidação da mobilização lipídica e diminuição das vias metabólicas de aminoácidos glicogênicos e aminoácidos ramificados. Essa alteração no metabolismo de glicerolipídios pode desequilibrar algumas funções importantes das células que afetam o desempenho da natação da espécie. Wu et al. (2014), em um estudo bioquímico, verificaram alterações na atividade da glutathione S-transferase (GST) em tecidos do cérebro e das brânquias de *D. rerio* em concentrações de 4 µg/L de fipronil. A GST tem importante papel na desintoxicação dos organismos e na transformação de substâncias para sua posterior eliminação (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Além disso, os autores observaram uma indução significativa nas atividades da 7-etoxicumarina O-desetilase (ECOD) no cérebro, brânquias, fígado e tecidos musculares. Esta atividade foi dependente da dose com maior concentração na última dose (doses entre 2 e 20 µg/L). A ECOD é uma atividade catalítica encontrada no sistema citocromo P450, que é um complexo enzimático importante na metabolização e excreção de substâncias. As atividades envolvidas nesse complexo são importantes fatores na avaliação de contaminação em sistemas aquáticos (GONZÁLEZ et al., 2009).

Na reprodução, fipronil reduziu significativamente a desova e as porcentagens de fecundação e eclosão, em concentrações de 16, 41 e 82 µg/L comparadas ao controle (ANCA; CRISTINA; GEORGESCU, 2013). Na última concentração, foi verificada uma diminuição de cerca de 20 % na desova, 19 % na fecundação e 61 % na eclosão dos ovos, mostrando que apesar de não ter tanta diferença nos dois primeiros parâmetros, a viabilidade dos ovos foi altamente prejudicada.

Com base na literatura e nos resultados obtidos nesta pesquisa, verifica-se que fipronil é uma substância altamente tóxica para *D. rerio*, visto que os efeitos são em doses baixas e relevantes ambientalmente. No Brasil, a dose mais alta de fipronil relatada até o momento é de 465 µg/L no estado de São Paulo (CETESB, 2018). Esta concentração é cerca de 170 % maior que o valor de  $CL_{50-96 h} = 172 \mu\text{g/L}$ , sendo assim, é possível afirmar que caso *D. rerio* ocorresse no Brasil, a presença dele estaria altamente ameaçada em locais onde concentrações como essa pudessem ser detectadas.

No caso da mistura dos dois agrotóxicos, 2,4-D e fipronil, Viana et al. (2020) avaliaram os efeitos de bioacumulação, bioquímicos e morfológicos dos dois produtos comerciais utilizados no presente trabalho, DMA<sup>®</sup> e Regent<sup>®</sup>. Neste experimento, os autores avaliaram as

mesmas concentrações utilizadas em mesocosmos no presente trabalho (sessões 7.2.3 e 7.3.3), com uma única exposição de 96 horas. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que ambos os agrotóxicos bioacumulam nos peixes. No aspecto bioquímico, fipronil inibiu a atividade catalase (CAT) e 2,4-D aumentou sua atividade, sendo que ambos os agrotóxicos, isolados e em mistura, aumentaram a atividade da GST, enzima citada anteriormente (WU et al. 2014). Com relação a CAT, ela é uma importante enzima antioxidante que trabalha na redução de espécies reativas de oxigênio que podem ser geradas pela presença de substâncias tóxicas como os agrotóxicos (HUGGETT et al., 1992). Sendo assim, diferenças dos níveis dessas enzimas com relação ao controle sinaliza resposta à toxicidade dos agrotóxicos estudados. Além delas, houve efeito significativo da atividade da AchE tanto nos produtos isolados como na mistura. Este efeito já havia sido reportado para ambos os ingredientes ativos na espécie (GAAIED et al., 2020; MOREIRA et al., 2021) e segundo Viana et al. (2020), a interação dos dois na mistura antagonizou o efeito de ambos. No entanto, para CAT e alterações morfológicas ocorreu efeito sinérgico.

Na mistura com outros agrotóxicos, não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliaram a ecotoxicidade para *D. rerio* da mistura de 2,4-D com outros compostos. No entanto, para o peixe nativo da América do sul *Cnesterodon decemmaculatus*, Arcaute et al. (2018) avaliaram a mistura de DMA<sup>®</sup> com outro herbicida inibidor de auxinas, dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico na versão comercial Banvel<sup>®</sup>). Os resultados dos autores mostraram efeitos aditivos e sinérgicos na mistura dos herbicidas. Dicamba, assim como 2,4-D, é frequentemente utilizado em monoculturas no Brasil, com registro até o momento de cinco produtos formulados para a utilização agrícola (AGROFIT, 2022) e tem alto potencial de lixiviação (INOUE et al., 2003). Para a mesma espécie, a genotoxicidade da mistura de formulações comerciais de 2,4-D (Dedalo Elite) e glifosato Credit<sup>®</sup> foi avaliada e os resultados mostraram efeitos sinérgicos sobre a avaliação genética de *C. decemmaculatus* (CARVALHO et al., 2020).

Para fipronil, a mistura com glifosato também foi avaliada, mas neste caso para *D. rerio* (CHAULET et al. 2019). Os resultados mostraram que ambos os ingredientes ativos isolados tiveram efeito sobre o padrão do comportamento da espécie, tornando-a mais vulnerável a predação, e a mistura potencializou os resultados. Glifosato é o herbicida mais utilizado no Brasil, e com presença detectada em regiões de plantio de cana-de-açúcar (ARMAS et al., 2007). Sendo assim, a presença dos três ingredientes ativos concomitantemente é uma possibilidade com grandes chances de ocorrer.

Com outros inseticidas, Wang et al. (2010) analisaram o efeito da mistura de fipronil com o inseticida organofosforado Triazofos para *D. rerio*. Triazofos é também um inseticida neurotóxico que tem como modo de ação a inibição da colinesterase. A presença dos dois inseticidas em conjunto apresentou efeito conjunto na sobrevivência e na expressão MicroRNA. MicroRNA são importantes RNAs não codificantes que possuem papel na expressão gênica de animais e plantas (BARTEL, 2004). Além disso, são cruciais nas respostas celulares a produtos tóxicos. Triazofos é um ingrediente ativo registrado para uso na agricultura no Brasil (AGROFIT, 2022), e assim como fipronil, já teve sua presença reportada em corpos d'água do país (MILHOME et al., 2011).

Na mistura de fipronil com os fungicidas piraclostrobina e tiofanato-metílico, Bevilaqua et al. (2020) observaram alterações no comportamento que aumentam a suscetibilidade à predação e alterações em parâmetros de estresse oxidativo em *D. rerio*, como CAT, razão SOD/CAT e NPSH. Como citado para CAT anteriormente, SOD (superóxido dismutase) e NPSH (tióis não proteicos) fazem parte do sistema antioxidante e colaboram para a prevenção de danos oxidativos nas células (FRIDOVICH, 1997; JONES et al., 2000). O mecanismo de efeito de piraclostrobina age na inibição da respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons (BARTLETT et al., 2002). Já tiofanato-metílico inibe a montagem dos microtúbulos do fuso, causando perda de cromátides ou cromossomos e não disjunção nas células-alvo (YANG et al., 2011). Estes fungicidas são utilizados no Brasil com 35 e 36 produtos formulados registrados, respectivamente (AGROFIT, 2022). O uso em mistura com fipronil é comumente utilizado com o objetivo de facilitar o manejo agrícola (BEVILAQUA et al., 2020), sendo assim, os corpos d'água próximos às áreas de plantações estão frequentemente expostos à essa mistura.

### 7.3.3. Testes de toxicidade em mesocosmos

A análise estatística mostrou diferenças entre os tratamentos e o tempo amostral na sobrevivência de *D. rerio* (ANOVA *repeated measures*  $F = 3,92$   $p = 0,00023$ ). Devido à suposição de que os níveis de oxigênio dissolvido nos mesocosmos serem um fator limitante para a sobrevivência dos peixes (Tabela 3), o último teste foi realizado em laboratório com a água dos mesocosmos com aeração uma vez ao dia, como realizado no item 7.2.2. A média de sobrevivência de *D. rerio* por tratamento, avaliada nos tempos T1, T3, T4 e T5, pode ser graficamente visualizada na Figura 40. A análise estatística mostrou que ao longo do tempo,

entre os controles, houve diferença entre o tempo T4 e T5 ( $p = 0,043$ ). Com relação ao controle e os tratamentos contaminados, em T3 todos eles foram diferentes do controle com exceção de D ( $p > 0,05$ ), com a significância do valor de  $p = 0,04$  e  $0,02$  para F e M, respectivamente. Os tratamentos V e MV não tiveram sobreviventes durante a avaliação em mesocosmos. Após o início dos testes, a cada coleta, os animais inseridos em V e MV morriam em menos de uma hora, mostrando a alta toxicidade destes tratamentos para o peixe. Em T5, no teste realizado em laboratório, ocorreu sobrevivência em V, mas não em MV. Não houve diferença entre o controle e os outros tratamentos em T4 e T5.

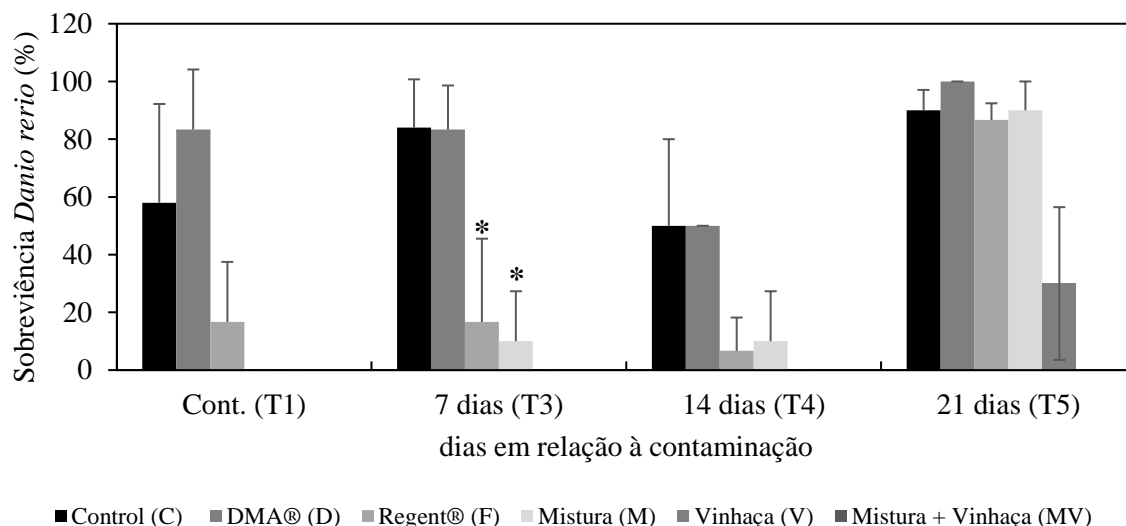
O tratamento D não foi diferente do controle em nenhum dos experimentos e nem entre si ao longo do tempo. Em T1 e T3, foi diferente de M ( $p = 0,02$  e  $0,04$ ), mas não de F ( $p = 0,093$ ). Em T4 e T5, assim como o controle, não teve diferenças significativas com os outros tratamentos. Já era esperado que os resultados obtidos em D acompanhassem o controle, devido a concentração de 2,4-D para a  $CL_{50-96}$  horas ser muito mais alta que as concentrações detectadas em mesocosmos (Tabela 4). Sendo assim, acredita-se que a mortalidade foi associada a outros fatores físicos e químicos, como é citado o oxigênio, para que a sobrevivência tivesse um alto desvio padrão entre as réplicas como foi visto. No caso, do oxigênio, segundo a norma NBR 15088 (ABNT, 2016), os níveis de OD devem ser maiores que  $4 \text{ mgO}_2/\text{L}$  e em diversos momentos o valor mensurado foi menor (Tabela 3).

No mesmo sentido, sabe-se que *D. rerio* é muito mais sensível ao fipronil que ao 2,4-D. Comparando a sobrevivência de F em T5, esta foi diferente dos outros tempos amostrais ( $p < 0,001$ ), mesmo quando as concentrações do inseticida foram muito próximas, no caso de T4 e T5 (Tabela 4). Esse resultado mostra, mais uma vez, que não é só os agrotóxicos que foram o fator limitante na sobrevivência dos peixes. Sendo assim, a partir dos resultados obtidos no presente trabalho e os estudos obtidos na literatura (veja 7.3.2), acredita-se que a baixa sobrevivência nos tratamentos F e M, foram decorrentes da associação da toxicidade do inseticida com níveis desfavoráveis dos parâmetros físicos e químicos, como o OD.

A comparação de F com outros tratamentos mostrou que ele não teve diferenças com D, M e V em nenhuma das coletas ao longo do tempo. Apresentando apenas a diferença já citada com C em T3 ( $p = 0,04$ ). M apresentou o mesmo padrão de resultados que F, com diferenças entre T4 e T5 ( $p = 0,0002$ ) com concentrações de fipronil praticamente iguais. A única diferença é que M teve diferenças com D ao contrário de F, em T1 e T3 como citado acima. A provável interação entre os agrotóxicos pode ter sido responsável pela diferença entre D e M, mas não

entre D e F. Assim como nos testes laboratoriais, alguns peixes expostos aos tratamentos contendo fipronil tiveram curvamento da coluna vertebral.

**Figura 40.** Sobrevivência média (%) de *D. rerio* exposto em mesocosmos (T1, T3 e T4) e a água dos mesocosmos em laboratório (T5). O asterisco (\*) indica tratamento diferente do controle.



O efeito mais pronunciado na espécie *D. rerio* foi a exposição aos tratamentos com a vinhaça V e MV. Em uma comparação dos parâmetros físicos e químicos dos tratamentos C, V e MV em T0 (antes da contaminação), T1 (contaminação), T3 (7 dias), T4 (14 dias) e T5 (21 dias) (Figura 41), onde nos quatro últimos foi onde teve exposição dos peixes aos mesocosmos e a água dos mesmos (T5), é possível observar grandes diferenças nos níveis de condutividade, turbidez, fósforo e amônia. Ainda é possível ver a mudança brusca na concentração de oxigênio dissolvido entre as coletas. Através da composição da vinhaça (Tabela 5. Parâmetros físicos e químicos da vinhaça bruta) pode-se visualizar que a sua introdução foi a maior responsável pela alteração brusca destes parâmetros. É hipotetizado que a rápida mortalidade dos tratamentos V e MV, após a contaminação, foi provocada pela redução da capacidade de consumir oxigênio, pois aparentemente a vinhaça interfere no sistema respiratório dos peixes, provocando coagulação da mucosa das brânquias (SAXENA; CHAUHAN, 2003) e consequente asfixia. Além disso, outros componentes em altas concentrações, como o potássio presente na vinhaça do presente trabalho, altera a funcionamento normal da regulação osmótica em peixes (ELIA NETO; ZOTELLI, 2008). Outro fator que pode influenciar a homeostase de *D. rerio* é o pH. Por exemplo, Zarangir (2014) observou que vários fatores fisiológicos do peixe são alterados na exposição em diferentes níveis de pH, cita-se comportamento, alimentação, tempo de eclosão de ovos e níveis de moléculas no sangue como glicose, hemácias e leucócitos. Em seus resultados, ele observou melhor aptidão dos peixes na faixa entre 6,5 e 8,2 e menor em meio

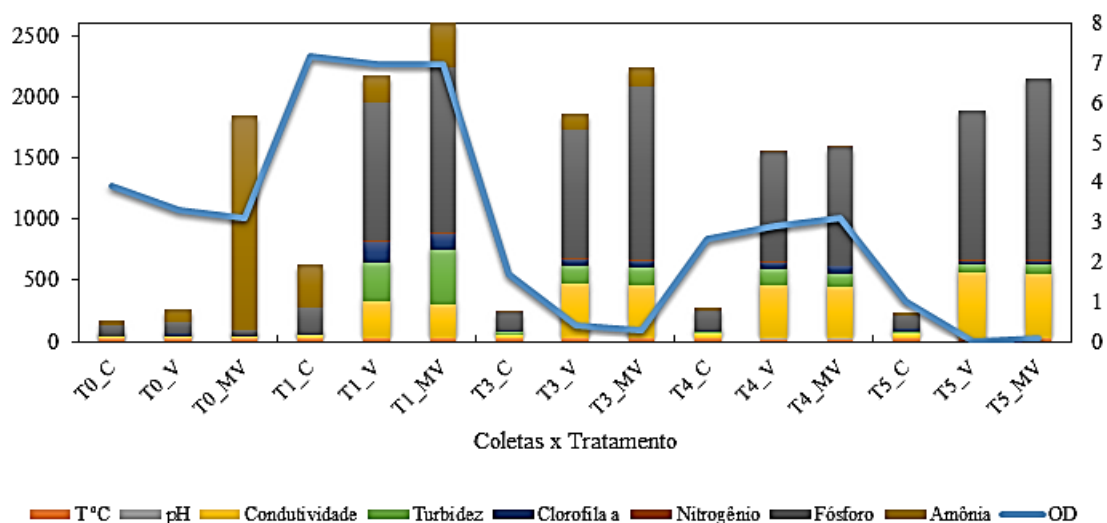
mais ácido (entre 5 e 6) e básico (entre 9-10). Ismail e Aripin (2020) avaliaram níveis ainda mais baixos de pH (entre 2-4) e observaram que *D. rerio* teve pior desempenho reprodutivo nessa faixa, com efeitos no comportamento natatório com fins reprodutivos, desova, fertilização e eclosão dos ovos. Nos experimentos do presente trabalho, os menores níveis de pH ocorreram no tratamento V e M, com medição nos valores na contaminação de 3,6 e 3,3, respectivamente. A média dos quatro valores de pH de C, V e MV, onde ocorreram exposição de *D. rerio*, foram de  $5,72 \pm 0,90$ ,  $5,05 \pm 1,14$  e  $4,98 \pm 1,30$ . Os demais tratamentos (D, F e M) tiveram a média de  $5,65 \pm 0,79$ ,  $5,55 \pm 0,81$  e  $5,67 \pm 0,94$ , valores estes bem próximos ao controle. Neste sentido, observando os valores e a relação com a literatura, percebe-se que os níveis de pH não eram os ideais para a espécie, principalmente em V e MV.

Outra observação pode-se ser feita com relação aos níveis do íon amônio quantificados no experimento (Tabela 3). Os valores de  $\text{NH}_4^+$  foram muito mais expressivos nos tratamentos V e MV. Estes valores podem estar ligados com a hipótese da alta decomposição de macrófitas e outros compostos orgânicos presentes no sistema. Decompositores podem atuar na matéria orgânica nitrogenada e liberar  $\text{NH}_3$  no ambiente, dependendo dos níveis de pH a amônia forma o hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) que se ioniza formando enfim o  $\text{NH}_4^+$  (SANTOS, 2022). Como os níveis de pH estavam mais ácidos do que básicos pode ter ocorrido a ionização de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Além disso, a alta presença de  $\text{NH}_4^+$  no meio pode sinalizar que pode ocorrer oxidação para nitrato (processo de nitrificação) (CABRAL, 2007). Altos níveis de nitrato podem interferir na sobrevivência de peixes e em seu comportamento natatório com impactos crônicos na saúde dos animais (DAVIDSON et al., 2014). Além dos fatores já citados, os níveis de metais contidos na vinhaça também podem interferir na sensibilidade dos peixes ao meio, sendo que alguns podem conter concentrações inferiores às detectáveis pelo método analítico (CAMILOTTI et al., 2007) ou ainda não terem sido selecionados para quantificação no método. Em resumo, através dos resultados obtidos no presente estudo e na literatura, pode-se afirmar que a vinhaça é extremamente tóxica para peixes, mesmo em porcentagens baixas no meio (SILVA et al., 2015), com efeitos graves na sobrevivência e com potencial citotóxico (MARINHO et al., 2014) a partir da alta variedade de substâncias com potencial tóxico em sua composição. E para o tratamento MV deve-se lembrar que 2,4-D e fipronil também estavam presentes, fator que certamente potencializou o efeito do tratamento que não teve sobreviventes ao final do teste, mesmo na avaliação em laboratório (T5).

No caso do controle, é teorizado que o consumo de oxigênio das outras espécies inseridas e a decomposição de macrófitas por decompositores aeróbios podem ter provocado a

redução dos níveis de oxigênio aproximando-os dos níveis dos tratamentos contaminados. Apesar de na literatura ter registros que *D. rerio* é bastante tolerante a hipóxia, principalmente em estágios iniciais de desenvolvimento (KOPP et al., 2014), os peixes utilizados no experimento antes de serem inseridos nos mesocosmos estavam em condições ótimas de OD, e provavelmente passaram todo seu ciclo de vida nessas condições ótimas e até mesmo as gerações anteriores, já que foram obtidos de um local de criação para pesquisa científica. Neste sentido, sabe-se que a aclimação é um fator importante na tolerância dos organismos às situações de estresse (SILVA; DAAM; GUSMAO, 2020). Sendo assim, a sensibilidade está relacionada não só a espécie em si, mas às condições as quais esta é exposta ao longo da vida. Isso pode ser observado no estudo de Barrionuevo et al. (2010), que mostrou que indivíduos da espécie *D. rerio* expostos em longo tempo a hipóxia moderada apresentaram maior aptidão em exposições agudas de hipóxia. O oxigênio dissolvido é vital para a sobrevivência dos organismos aquáticos, mantendo a estabilidade de fatores como crescimento, metabolismo energético, alimentação e outras funções fisiológicas. As principais consequências para *D. rerio* em baixos níveis de oxigênio são alterações nas funções cardiovasculares e metabólicas. Estas, podem ter sido responsáveis pela mortalidade dos peixes nos mesocosmos do controle do presente experimento. Essa problemática, somada com o estresse da exposição aos outros fatores físicos e químicos, como pH, níveis de amônia e a contaminação pelos agrotóxicos certamente foram os responsáveis pela resposta com grande variabilidade vista nos experimentos ao longo do tempo (Figura 40).

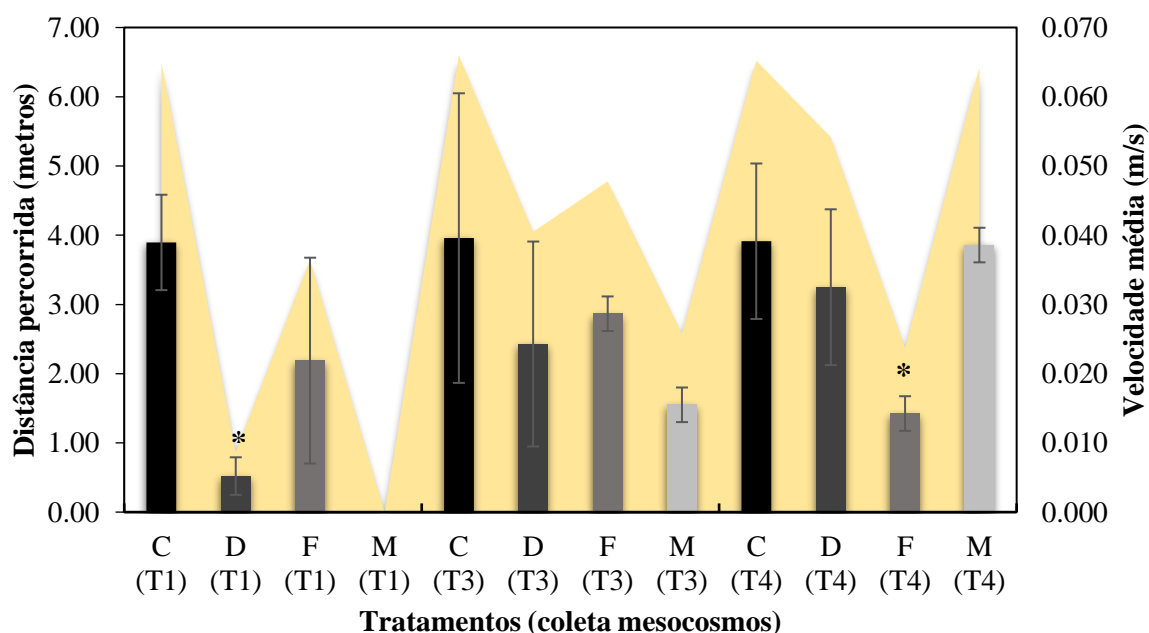
**Figura 41.** Comparação dos parâmetros físicos e químicos dos tratamentos C, V e MV. O eixo secundário (lado direito) é a escala dos níveis de oxigênio dissolvido (OD) e o eixo primário (lado esquerdo dos demais parâmetros)



### 7.3.4. Avaliações pós-exposição aos tratamentos contaminados

A análise estatística mostrou diferenças entre os tratamentos no tempo amostral (ANOVA *repeated measures*  $F = 4,17$   $p = 0,007$ ). No entanto, assim como para sobrevivência, os desvios-padrão de cada tratamento foram grandes e poucas diferenças significativas foram observadas. As diferenças em relação ao controle foram na coleta da contaminação (T1) com D ( $p = 0,01$ ) e com F ( $p = 0,003$ ) na coleta de 14 dias (T4), ambos com uma distância percorrida e consequente velocidade média menor que o controle (Figura 42). A mistura em T3 aparece menor que o controle, mas não estatisticamente diferente. Não houve diferenças entre o controle ao longo do tempo e nem os tratamentos contaminados entre si. Os tratamentos V e MV não aparecem no gráfico por não ter sobreviventes para o experimento.

**Figura 42.** Comportamento natatório de *D. rerio* pós-exposição aos tratamentos em mesocosmos. As letras representam os tratamentos controle (C), DMA<sup>®</sup> (D), Regent<sup>®</sup> (F) e Mistura (M) nos tempos T1 (contaminação), T3 (após 7 dias) e T4 (após 14 dias). Os asteriscos (\*) representam diferenças estatísticas com o controle ( $p < 0,05$ )



Sabe-se que a natação para organismos do nécton, como *D. rerio*, desempenha papel importante na predação tanto para predar como para fugir do predador (MUTO; KAWAKAMI, 2013). É sabido que agrotóxicos podem alterar o comportamento natatório dos peixes (PAMANJI et al., 2015; ANDRADE et al., 2016; VELKI et al., 2017), reduzindo ou aumentando a distância percorrida e consequente velocidade (LITTLE et al., 1990).

No caso de 2,4-D, as alterações comportamentais que o herbicida pode acarretar em peixes são ansiedade, abalos súbitos, perda de equilíbrio, natação descoordenada, natação na



superfície, dificuldades respiratórias, excesso de secreção de muco, miotonia e anorexia (FARAH et al., 2004; SARIKAYA; SELVI, 2005). Para *D. rerio*, Gaaied et al. (2020) observaram que uma baixa concentração de 2,4-D (20 µg/L) foi suficiente para reduzir a distância percorrida de embriões. Além disso, 2,4-D pode diminuir a capacidade de larvas de *D. rerio* de fugir de predadores (DEHNERT; KARASOV; WOLMAN, 2019), efeito que já foi observado em outras espécies de peixe também (LITTLE et al., 1990). Por outro lado, uma avaliação realizada com adultos de *D. rerio* obteve uma atividade motora aumentada na exposição de doses baixas de 2,4-D (3 a 300 µg/L) e o aumento significativo da distância percorrida (THIEL et al., 2020). No entanto, apesar de maior velocidade os peixes passaram mais parte do tempo na superfície do que no fundo onde é a característica de um comportamento defensivo. Sendo assim, independentemente de ser larva ou adulto, a presença de 2,4-D pode tornar a espécie *D. rerio* mais vulnerável à predação mesmo em doses relevantes ambientalmente.

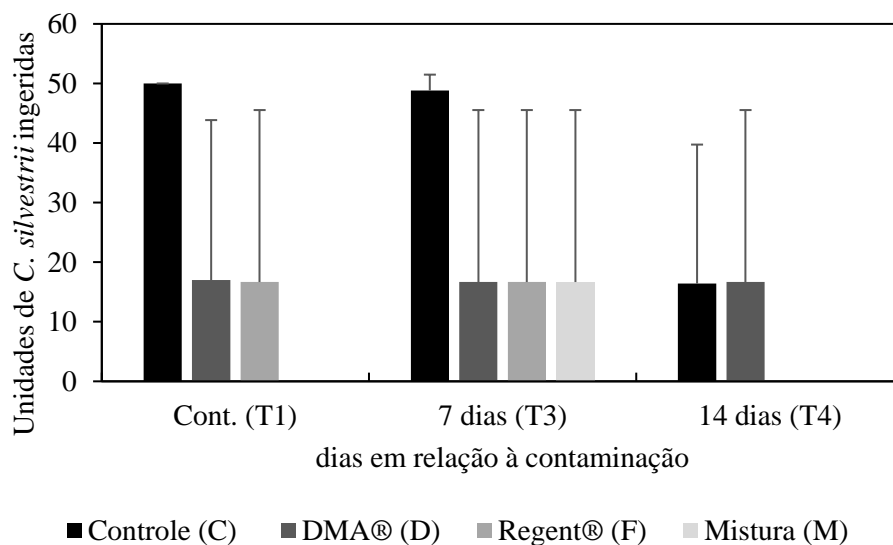
Para as formulações utilizadas no presente trabalho, Moreira et al. (2021) avaliaram o comportamento natatório e evitamento de gradiente de contaminação dos dois produtos DMA<sup>®</sup> e Regent<sup>®</sup>, para *D. rerio* e *H. eques*. O estudo observou que ambas as espécies foram capazes de detectar a presença dos dois agrotóxicos no meio. No entanto, apenas *D. rerio* foi capaz de evitar fipronil, ainda, o inseticida alterou a distância percorrida dos peixes, com diminuição da distância média nas concentrações de 50, 75 e 100 µg/L. Em contrapartida, em doses menores (entre 0.2 e 20 µg/L), Cuenca et al. (2020) observou que ao contrário do que acontece naturalmente com a espécie (SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999), na exposição ao Regent<sup>®</sup>, *D. rerio* não deu preferência para ambientes escuros, tendo uma presença maior na luz quando comparado ao controle. Também em doses baixas, (entre 9 e 27 µg/L), Chaulet et al. (2019) não observaram diferenças na distância percorrida, porém, foi observado que os peixes movimentaram-se mais entre as zonas inferior e superior do recipiente-teste, passando menos tempo na zona de fundo. Ambos os estudos acima, mostram comportamento que aumenta a exposição do peixe à predação. Este efeito foi potencializado em mistura com o herbicida glifosato em Chaulet et al. (2019). Neste caso, ambos os agrotóxicos são conhecidos por inibir a AChE (LOPES et al., 2017; MOREIRA et al., 2021), e isso pode levar a uma hiperatividade nos peixes. Neste sentido, acreditou-se que a mistura de 2,4-D e fipronil também poderia apresentar efeitos diferentes dos produtos isolados já que o herbicida também altera a atividade da AChE (GAAIED et al., 2020; VIANA et al., 2022).

Fipronil também pode alterar o comportamento de embriões de *D. rerio*. Em um estudo utilizando Regent<sup>®</sup>, Cuenca et al. (2022) observaram uma diminuição da distância e do tempo

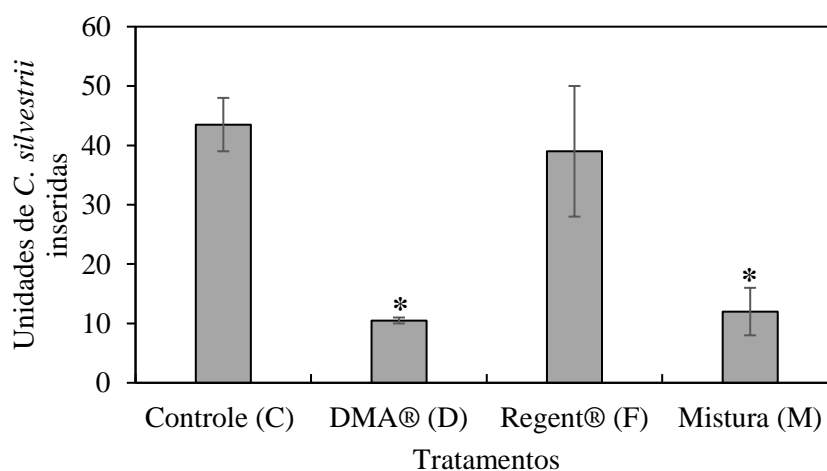
de movimento nas concentrações de 100 e 200 µg/L e total falta de movimentação nas concentrações de 400, 800 e 1600 µg/L. No mesmo sentido, Stehr et al. (2006) verificaram que quanto expostos à uma concentração de 333 µg/L os embriões eram incapazes de nadar, apenas respondendo a estímulos com contrações ondulatórias. Esta resposta dos embriões foi dependente da dose, sendo que quanto maior a dose maior foi a inibição natatória. Neste estudo, os defeitos locomotores provocados pelo inseticida foram reversíveis com função restaurada em 24 horas, ao contrário do que ocorreu com os organismos expostos no presente trabalho à fipronil e a mistura em laboratório que tiveram a persistência dos efeitos após sete dias de observação (tópico 7.3.2).

O comportamento saudável de um peixe possibilita que este tenha a característica antipredatória, mantendo-se nas bordas ou fundo dos corpos d'água, usando aspectos de camuflagem e escondendo-se em áreas mais escuras. A diminuição da aptidão de espécies presa como *D. rerio*, favorece os predadores e pode afetar a cadeia trófica do sistema aquático (COLWILL; CRETON, 2011). Em suma, independente de efeitos reversíveis ou não, através dos estudos encontrados na literatura e dos resultados obtidos no presente estudo, é possível afirmar que os agrotóxicos 2,4-D e fipronil afetam o comportamento de *D. rerio* em doses relevantes ambientalmente expondo a espécie à predadores e podendo diminuir sua capacidade de forragear.

Para o teste de alimentação, assim como para a sobrevivência e o comportamento natatório, a variação entre as réplicas dos tratamentos foi alta e dificultou a significância das análises estatísticas. Como as três coletas apresentarem essa alta variabilidade, a normalidade e a homogeneidade das amostras não foram significativas, com isso, optou-se por analisá-las individualmente através de análise não paramétrica (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Dunn). As três análises individuais de T1 ( $F = 8,67$   $p = 0,34$ ), T3 ( $F = 2,80$   $p = 0,42$ ) e T4 ( $F = 2,91$   $p = 0,40$ ) não mostraram diferenças significativas entre o controle e os tratamentos contaminados. Graficamente é possível ver que nas duas primeiras coletas a resposta do controle é menos variável que os tratamentos (Figura 42). Em T1, não houve sobreviventes suficiente no tratamento da mistura para ser testado, enquanto que em T4 os animais que estavam em F e M, antes da avaliação, não se alimentaram.

**Figura 43.** Teste de alimentação pós-exposição em mesocosmos com *D. rerio*

Em contrapartida, em um experimento de alimentação adicional realizado em laboratório, onde *D. rerio* foi exposto às mesmas concentrações dos agrotóxicos aplicadas no mesocosmos, utilizando água de cultivo, pode-se perceber uma variação menor nas réplicas do teste de alimentação pós-exposição. A análise estatística (ANOVA one way  $F = 23,13$   $p < 0,001$ ) mostrou diferenças significativas do controle com os tratamentos contaminados DMA® e da mistura ( $p < 0,01$ ). Os organismos que estavam nestes tratamentos tiveram uma taxa de alimentação menor que o controle e fipronil, indicando que o herbicida interferiu na taxa de alimentação dos peixes após a exposição.

**Figura 44.** Teste de alimentação pós-exposição em laboratório com *D. rerio*. Asteriscos (\*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ )

A alimentação é um dos fatores essenciais que colabora para a homeostase de organismos vivos em geral. Peixes são predadores que dependem de uma boa capacidade de

locomoção para garantir o sucesso na captação de alimento. É sabido que alterações no comportamento estão intimamente ligadas à redução nas taxas de alimentação (LITTLE et al., 1990).

Com relação ao herbicida 2,4-D, este pode provocar distúrbios na capacidade de estabelecer e consumir quantidades apropriadas de alimento, o que pode acarretar alterações no peso corporal e diminuição da aptidão dos organismos (BROWNE; MOORE, 2014). Little et al. (1990), em um experimento de consumo de cladóceros como o realizado no presente trabalho, verificaram que quanto maior a concentração de 2,4-D menor foi a porcentagem de consumo da espécie de peixe *Oncorhynchus mykiss*.

Para *D. rerio*, Dehnert et al. (2019) analisaram a capacidade do peixe de se alimentar de *Paramecium* na presença do ingrediente ativo 2,4-D e do produto formulado DMA4<sup>®</sup>IVM, observando que quanto maior a dose de ambos, menor foi a captura dos protozoários. Em comparação com o controle, o máximo da redução foi 20 % para o ingrediente ativo em uma dose de 4 mg/L e 24 % para o produto formulado na concentração de 16 mg/L. Os autores concluíram que a exposição ao herbicida diminuiu a frequência de movimentos natatórios com a intenção de captura de presa. Através da análise da atividade neuronal tectal os autores observaram que 2,4-D prejudica o sistema visual, que conseqüentemente diminui as manobras de captura e a ingestão de alimentos. Como a visão está associada à circuitos neurais (RANDLETT et al., 2015), este efeito demonstra novamente a capacidade neurotóxica de 2,4-D para a espécie.

Os dados obtidos no experimento em laboratório corroboram com os resultados de alimentação dos estudos citados, através da diminuição da alimentação nos tratamentos onde havia presença de 2,4-D (D e M). Ainda, apesar do grande desvio padrão dos animais em mesocosmos, é possível verificar que alguns adultos que foram expostos aos agrotóxicos se alimentaram menos que o controle, onde há menor variabilidade entre a taxa de ingestão de *C. silvestrii*.

É importante frisar que os efeitos no comportamento e na alimentação podem sinalizar que as espécies de peixes podem se tornar vulneráveis na presença do herbicida pela diminuição da aptidão, e com a presença do herbicida em muitos locais com atividades agrícolas (CETESB, 2018), fica a preocupação do impacto que já está ocorrendo nos ecossistemas naturais.

Para fipronil, até momento, não foram encontrados estudos na literatura sobre a capacidade da toxicidade do inseticida interferir na taxa de predação de *D. rerio* e nem de outra espécie de peixe. No entanto, um estudo com a inserção de fipronil na dieta de peixes, mostrou uma série de alterações em biomarcadores fisiológicos e metabólicos, marcadores de estresse

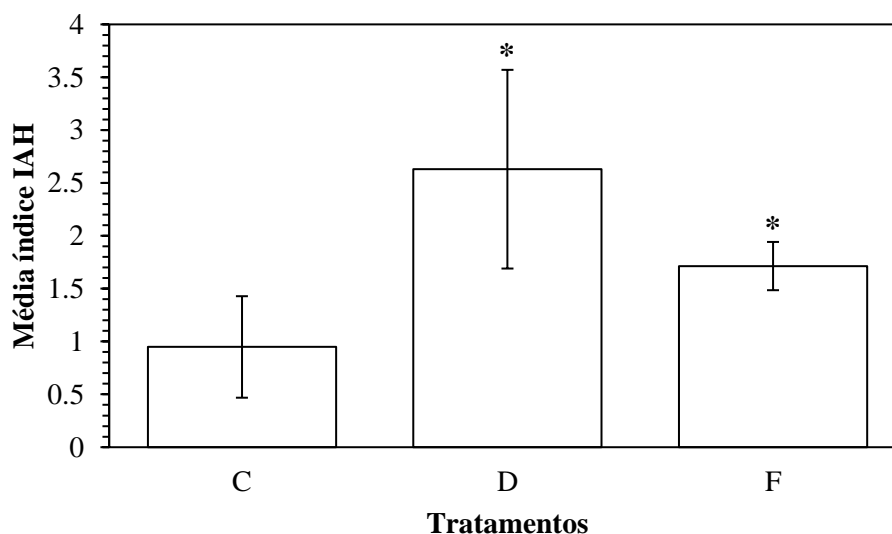
oxidativo e enzimas digestivas (DALLARÉS et al., 2020). Com relação a outros vertebrados, a administração oral de fipronil na espécie de ave *Colinus virginianus* inibiu a ingestão de água e comida, fazendo com que as aves perdessem uma quantidade considerável de massa corporal (KITULAGODAGE et al., 2011). Outro experimento mostrou que a injeção de fipronil no saco vitelino de ovos de *Gallus domesticus* fez com que, após a eclosão, estes organismos tivessem taxa de alimentação reduzida e também consequente perda de massa corporal (KITULAGODAGE; BUTTEMER; ASTHEIMER, 2011). Para mamíferos, fipronil também é citado por provocar diminuição do consumo de alimento, eficiência na conversão energética e perda de peso (TINGLE et al., 2003).

### **7.3.5. Histologia de brânquias**

Com relação a histologia de brânquias, devido à alta mortalidade dos peixes no experimento não foi possível realizar a análise em todas as amostragens pela ausência de número mínimo de exemplares para validar a análise estatística. Neste sentido, foram realizadas as análises da exposição dos peixes em T1 (logo após a contaminação) e T5 (exposição em laboratório com a água dos mesocosmos de 21 após a contaminação).

No dia da contaminação foi possível apenas coletar brânquias de animais nos tratamentos C, D e F devido à ausência de sobrevivência nos demais tratamentos. A análise estatística do índice de alteração histopatológica (IAH) da exposição de *D. rerio* exposto em mesocosmos mostrou significância no nível de alterações histológicas dos tratamentos contaminados quando comparados ao controle (Kruskal-Wallis  $H_2 = 54,81$   $F = 44,73$   $p < 0,0001$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ; Figura 45). Não houve diferenças significativas entre D e F ( $p > 0,05$ ).

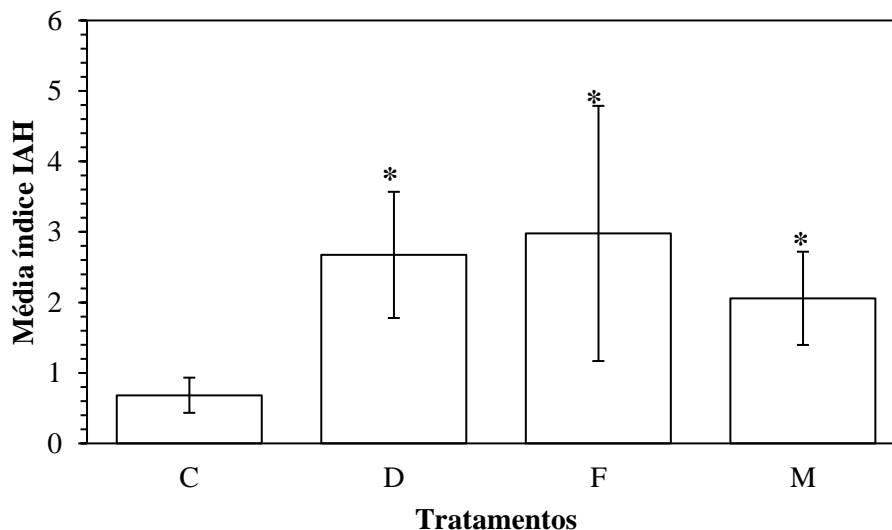
**Figura 45.** Média  $\pm$  DP de índice de alteração histopatológica (IAH) para brânquias de *D. rerio* expostos aos tratamentos C (controle), D (DMA<sup>®</sup>) e F (Regent<sup>®</sup>) no dia da contaminação dos mesocosmos. Asteriscos (\*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ )



Para as frequências quantificadas pela porcentagem de danos (Tabela 15), foi realizada a análise estatística para as que apresentaram porcentagens diferentes, segundo o método proposto. Deste modo, as análises mostraram diferenças significativas na variável hipertrofia do tratamento D quando comparado a C e F (Kruskal-Wallis  $H_2 = 119,82$   $F = 119,98$   $p < 0,0001$ ; Método de Dunn,  $p > 0,05$ ). Não houve diferenças significativas entre C e F ( $p > 0,05$ ). No caso da hiperplasia, foram evidenciadas diferenças tanto de D ( $p = 0,009$ ) quanto de F ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle, bem como diferenças entre D e F ( $p < 0,0001$ ). As médias das frequências mostraram que os danos foram de  $C < D < F$ , com danos presentes em C e D e frequentes em F (Tabela 15). Para fusão parcial (Figura 47A), os resultados da análise mostraram diferenças significativas de F com o C ( $p = 0,001$ ) e de F com D ( $p = 0,02$ ), mas não entre D e C ( $p = 0,85$ ) (Kruskal-Wallis  $H_2 = 20,06$   $F = 15,73$   $p < 0,0004$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ), sendo que apenas para F as fusões são raramente presentes (Tabela 15) e ausentes em D e C na classificação, que segue o método de Paulino et al. (2014).

A respeito do experimento em laboratório, assim como no experimento em mesocosmos não foi possível obter dados de todos os tratamentos devido à alta mortalidade. Neste caso, apenas em V e MV não houve material suficiente para as análises. A análise estatística do IAH mostrou diferença de todos os tratamentos contaminados com relação ao controle (Kruskal-Wallis  $H_3 = 123,07$   $F = 62,07$   $p < 0,0001$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ; Figura 46).

**Figura 46.** Média de índice de alteração histopatológica (IAH) para brânquias de *D. rerio* expostos em laboratório a água dos tratamentos dos mesocosmos C (controle), D (DMA<sup>®</sup>) e F (Regent<sup>®</sup>) e M (DMA<sup>®</sup> + Regent<sup>®</sup>) de 21 dias após a contaminação. Asteriscos (\*) indicam tratamentos com diferenças estatísticas do controle ( $p < 0,05$ )



Assim como realizado para as análises do dia da contaminação, as frequências de danos foram quantificadas (Tabela 15) com posterior análise estatísticas das variáveis com alterações. Para a variável hipertrofia, a análise mostrou diferenças estatísticas de D e F com relação ao controle (Kruskal-Wallis  $H_3 = 157,55$   $F = 139,53$   $p < 0,0001$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ), com frequência de danos  $C < D < F$  (Figura 47A). Com relação aos tratamentos contaminados, todos tiveram diferenças significativas entre si ( $p < 0,006$ ), com menores danos em M, seguido de D e F. Em relação à variável hiperplasia (Figura 47B), os resultados da análise mostraram também diferenças estatísticas de D e F com relação ao controle (Kruskal-Wallis  $H_3 = 39,32$   $F = 4,19$   $p < 0,0001$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ). No caso dos tratamentos contaminados, houve diferença de M com os tratamentos D e F ( $p < 0,02$ ), mas não entre eles ( $p = 0,55$ ). A frequência dos danos para hiperplasia foi  $C < M < F < D$ . A última variável com alterações foi a hiperplasia de células de cloreto (CC) (Figura 47C). A análise mostrou que apenas M foi diferente do controle e consequentemente diferentes dos outros tratamentos contaminados (Kruskal-Wallis  $H_2 = 68,04$   $F = 64,23$   $p < 0,0001$ ; Método de Dunn,  $p < 0,05$ ). A porcentagem de danos de M foi de 12 % e classificada como raramente presente (Tabela 15).

**Tabela 15.** Frequência de danos histológicos nas brânquias de *D. rerio*

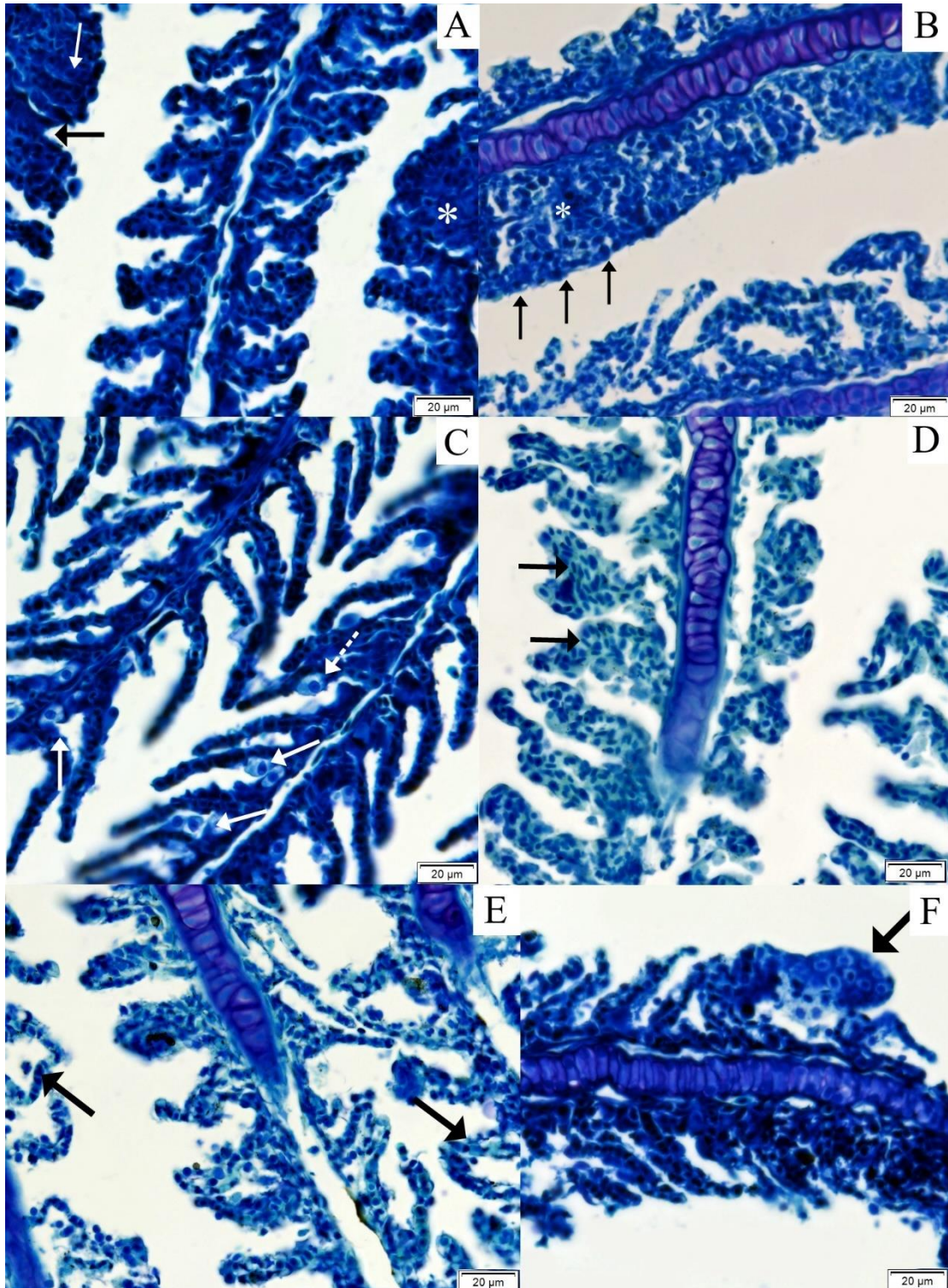
Variáveis	Estágio	Mesocosmos Contaminação			Laboratório 21 dias após contaminação			
		Controle	DMA <sup>®</sup>	Regent <sup>®</sup>	Controle	DMA <sup>®</sup>	Regent <sup>®</sup>	Mistura
"Lifting"	I	0	0	0	0	0	0	0
Hipertrofia	I	0	0+	0	0	0+	+	0
Hipertrofia CC*	I	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia	I	+	+	++	0+	+	+	+
Hiperplasia CC*	I	0	0	0	0	0	0	0+
Fusão parcial	I	0	0	0+	0	0	0	0
Congestão lamelar	I	0	0	0	0	0	0	0
Fusão total	II	0	0	0	0	0	0	0
Aneurisma	II	0	0	0	0	0	0	0

0 ausente; 0+ raramente presente; + presente; ++ frequente; +++ muito frequente

\* CC – células de cloreto



**Figura 47.** Filamentos branquiais e lamelas de *D. rerio* expostos aos tratamentos C, D, F e M. **(A)** Seta preta indica fusão parcial lamelar. Seta branca indica hipertrofia das células lamelares. Asterisco branco indica fusão total das lamelas (em F). **(B)** Fusão total das lamelas e hiperplasia (em D). **(C)** Setas brancas contínuas indicam hiperplasia das células cloreto. Seta branca pontilhada indica hipertrofia da célula cloreto (em M). **(D)** Congestão lamelar (em C). **(E)** *Lifting* de epitélio lamelar (em D). **(F)** Aneurisma apical (em C).



Em resumo, a histologia de brânquias realizada no presente trabalho mostrou diferenças significativas de todos os tratamentos contaminados com o controle através do índice de alterações histopatológicas (IAH). Além disso, as análises estatísticas das variáveis presentes nos danos histológicos que foram resumidos na Tabela 15, mostraram que os tratamentos contaminados foram diferentes do controle, sinalizando maior dano nos mesocosmos com agrotóxicos. Hiperplasia foi a variável com maior frequência nas brânquias de *D. rerio*, seguida de hipertrofia. As variáveis hiperplasia de CC e fusão parcial também foram significativas na análise e com significância estatística em relação ao controle. Apesar das variáveis significativas serem de grau I, ou seja, lesões pouco graves, que não comprometem o funcionamento do órgão, reversíveis e pontuais, não é possível afirmar que estas lesões não pudessem atingir um grau mais grave ao longo do tempo, já que a exposição de *D. rerio* neste experimento foi apenas de quatro dias. Sendo assim, não se sabe o que aconteceria em uma exposição mais longa ou com níveis de contaminação mais altos, como os detectados pela CETESB (2018). Os efeitos são reversíveis e pontuais em situações onde a substância tóxica é removida ou dissipada do ambiente, ou seja, em caso contrário as patologias podem progredir (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994) acometendo a aptidão na realização da troca gasosa levando à hipoxia interna (FERNANDES; MORON; SAKURAGUI, 2007).

Ainda, o IAH apesar de ser uma ferramenta útil na análise das alterações histológicas, muitas vezes subestima os resultados, já que considera de mesmo peso porcentagens de 11 e 25 % por exemplo. Apesar de não possuírem significância nas médias das frequências, danos de grau II (lesões moderadamente graves que podem afetar o funcionamento do órgão podem ser irreversíveis, mas em geral são pontuais) como a fusão total, tiveram uma presença constante nos tratamentos contaminados. Mesmo assim, apesar das diferenças citadas e da frequência apresentada, como todos os tratamentos tiveram um nível de IAH menor que 10, as brânquias analisadas são consideradas estruturalmente normais.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os resultados obtidos no trabalho de Viana et al. (2020), onde as mesmas concentrações da contaminação do mesocosmos para D, F e M foram avaliadas para a espécie *D. rerio*, utilizando água de cultivo. Assim como observado no artigo, através das significâncias obtidas nas análises estatísticas, o tratamento da mistura também parece apresentar antagonismo com relação aos danos. Além disso, a hiperplasia também foi a variável mais frequente nos cortes histológicos.

As alterações morfológicas nas brânquias dos peixes observadas neste estudo, como hiperplasia, hipertrofia e fusão parcial das lamelas são recursos de proteção que ampliam a distância de difusão água-sangue, objetivo de diminuir a transferência de substâncias estressoras e tóxicas como os agrotóxicos da superfície lamelar para o sangue (FERNANDES; MORON, 2020). Apesar de não significativas para o índice IAH é certo que as diferenças com o controle mostram os mecanismos de defesa dos peixes em alerta.

Outros estudos realizados na literatura com 2,4-D e fipronil mostram alterações histopatológicas com outras espécies de peixe. Por exemplo, para 2,4-D os resultados de Vigário e Sabóia-Morais (2014) corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho com alterações histopatológicas de hiperplasia epitelial, fusão lamelar, além de alterações nos grânulos glicoconjugados das células mucosas em concentrações relevantes ambientalmente de 10 a 40 µg/L para a espécie *Poecilia vivípara*. As autoras deste estudo citam que a alta frequência de hiperplasia nas brânquias dos peixes expostos à 2,4-D sugerem tentativa de aumentar a secreção de muco como mecanismo de proteção do órgão. Já a função lamelar que foi significativa na exposição à fipronil, é a tentativa de diminuir a superfície de troca gasosa exposta a ação dos agrotóxicos.

Para fipronil, Ardeshir et al. (2017), observaram nas brânquias da espécie de peixe *Rutilus frisii* alterações histopatológicas significativas nas concentrações de 600 e 700 µg/L de fipronil, cita-se hipertrofia, hiperplasia, aneurisma, fusão extensa, deleção e necrose. Já em Ghaffar et al. (2018), a exposição ao fipronil em doses entre 20 e 100 µg/L da espécie *Cyprinus carpio* mostraram alterações histopatológicas graves, como desorganização nos arranjos das lamelas primárias e secundárias, tamanho reduzido das lamelas secundárias, necrose das células epiteliais lamelares, congestão severa nos núcleos cartilagosos, descamação e fusão das lamelas secundárias.

No caso do efeito em misturas, Qureshi et al. (2016) observaram diferenças nos níveis das variáveis entre a exposição isolada de fipronil (400 µg/L) e a combinação com o inseticida buprofezina. Na exposição isolada, as alterações mais representativas foram atrofia lamelar e necrose celular, enquanto na mistura congestão de células sanguíneas, desorganização lamelar e edema intersticial.

Em suma, os agrotóxicos avaliados provocam danos histopatológicos em *D. rerio*. Independente do grau de alterações, as brânquias possuem papel essencial na respiração, osmorregulação e regulação ácido-base dos peixes. Além disso, são a principal porta de entrada

de xenobióticos, sendo assim, é necessário investigar as consequências à longo prazo que a exposição à essas substâncias podem provocar na aptidão de espécies de peixes como *D. rerio*.

#### 7.4. Conclusão

O presente estudo mostrou que a exposição aos agrotóxicos e a vinhaça provocaram alterações na sobrevivência, comportamento, alimentação e nas brânquias de *D. rerio*. Com relação à sobrevivência, percebeu-se que os parâmetros físicos e químicos foram fatores limitantes. Nos tratamentos contaminados, o baixo pH, os níveis de potássio, amônio e nitrogênio, além de outros fatores, fizeram dos tratamentos que continham vinhaça os mais tóxicos para a sobrevivência, com ausência de sobreviventes e rápida mortalidade em mesocosmos e na exposição em laboratório no tratamento contendo também os agrotóxicos.

Por outro lado, o herbicida 2,4-D teve um alto valor de CL-96 horas e não houve mortalidade neste tratamento na avaliação das misturas e nem diferenças estatísticas com o controle em mesocosmos. No entanto, foi perceptível sua influência nos resultados do teste das misturas, na alimentação e na histologia de brânquias. Isoladamente, teve um efeito significativo no comportamento natatório dos peixes, na alimentação e nas variáveis de hipertrofia e hiperplasia das brânquias dos peixes. Na literatura, o 2,4-D é citado por provocar alterações nos sistemas nervoso central, cardiovascular e hepático de *D. rerio*, sendo assim, é uma substância que merece atenção em relação aos danos subletais.

No caso de fipronil, os valores médios de CL<sub>50</sub> e CL<sub>10-96</sub> horas obtidos estão dentro das concentrações quantificadas em corpos d'água no estado de São Paulo (CETESB, 2018). Além disso, causou efeitos subletais nos testes de avaliação aguda com danos comportamentais como imobilidade, dificuldade na natação, natação na superfície, dificuldades de equilíbrio e curvamento da coluna vertebral, todos eles aparentemente irreversíveis na avaliação pós-exposição de sete dias. Além disso, influenciou na sobrevivência dos peixes em mesocosmos, potencializando os efeitos da mistura com 2,4-D, tendo um efeito significativo no comportamento natatório dos peixes e nas variáveis hipertrofia, hiperplasia e fusão parcial das brânquias dos peixes. Na literatura, é citado por seus efeitos genéticos, enzimáticos, comportamentais, reprodutivos e de crescimento, com grande parte dos estudos utilizando doses ambientalmente relevantes. Neste sentido, é correto afirmar que fipronil é extremamente tóxico para *D. rerio*.

Em conclusão, com o cenário de expansão da cana-de-açúcar, a frequência da presença dos agrotóxicos, sejam eles isolados ou em mistura nos corpos d'água, e o descarte de efluentes ou

lixiviação de resíduos como a vinhaça, põe em risco o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos pelo efeito provocado em consumidores da cadeia trófica como *D. rerio*. Sendo assim, é necessário a avaliação da toxicidade destes produtos para espécies nativas com presença frequente nos sistemas aquáticos próximos a cultivos de cana-de-açúcar no Brasil. Isso colaborará para uma avaliação mais robusta de efeitos e consequente intervenção sobre os limites de uso e detecção, além de melhor controle do uso e comercialização.

## Referências

- ABDEL-MONEIM, A.; MOREIRA-SANTOS, M.; RIBEIRO, R. A short-term sublethal toxicity assay with zebra fish based on preying rate and its integration with mortality. **Chemosphere**, v. 120, p. 568–574, 1 fev. 2015.
- ABNT. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes**. Disponível em: <<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=353939>>. Acesso em: 26 out. 2017.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 1 abr. 2022.
- ANCA, B.; CRISTINA, E. M.; GEORGESCU, B. The effect of fipronil on some reproduction parameters of zebrafish (*Danio rerio*). **AACL Bioflux**, v. 6, p. 71–73, 1 mar. 2013.
- ANDERSEN, Ø. et al. Salmon Antithrombin Has Only Three Carbohydrate Side Chains, and Shows Functional Similarities to Human  $\beta$ -Antithrombin. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 6, p. 1651–1657, 2000.
- ANDRADE, T. S. et al. Carbendazim Exposure Induces Developmental, Biochemical and Behavioural Disturbance in Zebrafish Embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 390–399, 1 jan. 2016.
- ARDESHIR, R. A. et al. Comparison of Waterborne and Intraperitoneal Exposure to Fipronil in the Caspian White Fish (*Rutilus Frisii*) on Acute Toxicity and Histopathology. **Toxicology Reports**, v. 4, p. 348–357, 1 jan. 2017.
- ARMAS, E. D. de et al. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, p. 1119–1127, out. 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, P. B. **Introdução associação brasileira da piscicultura**. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/>>. Acesso em: 4 abr. 2022.
- BAILONE, R. L. et al. Zebrafish as an alternative animal model in human and animal vaccination research. **Laboratory Animal Research**, v. 36, n. 1, p. 13, 7 maio 2020.
- BARRIONUEVO, W. R.; FERNANDES, M. N.; ROCHA, O. Aerobic and Anaerobic Metabolism for the Zebrafish, *Danio rerio*, Reared under Normoxic and Hypoxic Conditions and Exposed to Acute Hypoxia during Development. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 425–434, maio 2010.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 23 jan. 2004.
- BARTLETT, D. W. et al. The Strobilurin Fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002.

BEGGEL, S. et al. Sublethal Toxicity of Commercial Insecticide Formulations and Their Active Ingredients to Larval Fathead Minnow (*Pimephales Promelas*). **The Science of the Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3169–3175, 15 jul. 2010.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. de. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**, p. 331–331, 2003.

BEMVENUTI, M. A.; FISCHER, L. G. Peixes: morfologia e adaptações. **Cadernos de Ecologia Aquática**, v. 5, n. 2, p. 31–54, 2010.

BENIJTS-CLAUS, C.; PERSOONE, G. The Influence of the Formulation of the Herbicide Paraquat on Its Toxicity for Aquatic Organisms. 1975. Disponível em: <<http://www.vliz.be/en/imis?refid=3525>>. Acesso em: 28 abr. 2020.

BEVILAQUA, F. et al. A Mixture of Fipronil and Fungicides Induces Alterations on Behavioral and Oxidative Stress Parameters in Zebrafish. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 29, n. 2, p. 140–147, mar. 2020.

BOELTER, J. P. **Rhincodon typus (Tubarão-baleia) Fauna digital do Rio Grande do Sul**, 2022. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/rhincodon-typus-tubarao-baleia/>>. Acesso em: 4 abr. 2022.

BROWNE, A. M.; MOORE, P. A. The Effects of Sublethal Levels of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicide (2,4-D) on Feeding Behaviors of the Crayfish *O. Rusticus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, n. 2, p. 234–244, 1 ago. 2014.

CABRAL, N. M. T. Teores de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) nas águas do aquífero Barreiras nos bairros do Reduto, Nazaré e Umarizal - Belém/PA. **Química Nova**, v. 30, p. 1804–1808, 2007.

CAMILOTTI, F. et al. Heavy metals accumulation in sugarcane after application in sewage sludge and vinasse. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n. 1, p. 284–293, 2007.

CARVALHO, W. F. et al. Genotoxicity of Mixtures of Glyphosate with 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Chemical Forms towards *Cnesterodon Decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 6, p. 6515–6525, 2020.

CETESB, C. A. do estado de S. P. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017**. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2018/06/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-das-%C3%81guas-Interiores-no-Estado-de-S%C3%A3o-Paulo-2017.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2020.

COLWILL, R. M.; CRETON, R. Locomotor Behaviors in Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. **Behavioural Processes**, v. 86, n. 2, p. 222–229, 1 fev. 2011.

CUENCA, A. L. R.; SIMONATO, J. D.; MELETTI, P. C. Acute Exposure of Embryo, Larvae and Adults of *Danio rerio* to Fipronil Commercial Formulation Reveals Effects on Development and Motor Control. **Ecotoxicology**, v. 31, n. 1, p. 114–123, 1 jan. 2022.



DA COSTA CHAULET, F. et al. Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 443–451, out. 2019.

DA FONSECA, M. B. et al. The 2,4-D Herbicide Effects on Acetylcholinesterase Activity and Metabolic Parameters of Piava Freshwater Fish (*Leporinus Obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 416–420, mar. 2008.

DALLARÉS, S. et al. Multibiomarker Approach to Fipronil Exposure in the Fish *Dicentrarchus Labrax* under Two Temperature Regimes. **Aquatic Toxicology**, v. 219, 2020.

DAVIDSON, J. et al. Comparing the Effects of High vs. Low Nitrate on the Health, Performance, and Welfare of Juvenile Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss* within Water Recirculating Aquaculture Systems. **Aquacultural Engineering**, v. 59, p. 30–40, 1 mar. 2014.

DEHNERT, G. K. et al. Effects of Low, Subchronic Exposure of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and Commercial 2,4-D Formulations on Early Life Stages of Fathead Minnows (*Pimephales Promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 10, p. 2550–2559, 2018.

DEHNERT, G. K.; KARASOV, W. H.; WOLMAN, M. A. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Containing Herbicide Impairs Essential Visually Guided Behaviors of Larval Fish. **Aquatic Toxicology**, v. 209, p. 1–12, 2019.

ELIA NETO, A.; ZOTELLI, L. C. **Caracterização das águas residuárias para reuso agrícola**. Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), 2008.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in action**. Rome, Italy: FAO, 2020.

FARAH, M. A. et al. Studies on Lethal Concentrations and Toxicity Stress of Some Xenobiotics on Aquatic Organisms. **Chemosphere**, v. 55, n. 2, p. 257–265, 1 abr. 2004.

FERNANDES, M. N.; MORON, S. E. Chapter 10 - Breathing and respiratory adaptations. Em: BALDISSEROTTO, B.; URBINATI, E. C.; CYRINO, J. E. P. (Ed.). **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**. Academic Press, 2020. p. 217–250.

FERNANDES, M. N.; MORON, S. E.; SAKURAGUI, M. M. Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. Em: **Fish Respiration and Environment**. Science publishers, Enfield, 2007. p. 93–120.

FRIDOVICH, I. Superoxide Anion Radical ( $O_2^-$ ), Superoxide Dismutases, and Related Matters\*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18515–18517, 25 jul. 1997.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. World Wide Web electronic publication, 2022. Disponível em: <www.fishbase.org>. Acesso em: 4 abr. 2022.

GAAIED, S. et al. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicide Effects on Zebrafish Larvae: Development, Neurotransmission and Behavior as Sensitive Endpoints. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 4, p. 3686–3696, 1 fev. 2020.



GERKING, S. D. **Feeding Ecology of Fish**. San Diego: Academic Press, 1994.

GHAFFAR, A. et al. Fipronil (Phenylpyrazole) Induces Hemato-Biochemical, Histological and Genetic Damage at Low Doses in Common Carp, *Cyprinus Carpio* (Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology**, v. 27, n. 9, p. 1261–1271, 1 nov. 2018.

GONZÁLEZ, J. F. et al. Kinetics of Hepatic Phase I and II Biotransformation Reactions in Eight Finfish Species. **Marine Environmental Research**, v. 67, n. 4–5, p. 183–188, jun. 2009.

GUPTA, S. K. et al. Dietary Microbial Levan Ameliorates Stress and Augments Immunity in *Cyprinus Carpio* Fry (Linnaeus, 1758) Exposed to Sublethal Toxicity of Fipronil. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 5, p. 893–906, 2014.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. de. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170–1179, 2008.

HUGGETT, R. J. et al. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. 1ª edição. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

INOUE, M. H. et al. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná. **Planta Daninha**, v. 21, p. 313–323, ago. 2003.

ISMAIL, I.; ARIPIN, S.-A. The effect of low pH level on zebrafish (*Danio rerio*) reproductive performance. © **Penerbit UMT**, v. 2, n. 1, p. 15–20, 2020.

JONES, D. P. et al. Redox State of Glutathione in Human Plasma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 4, p. 625–635, 15 fev. 2000.

KITULAGODAGE, M. et al. Fipronil Toxicity in Northern Bobwhite Quail *Colinus Virginianus*: Reduced Feeding Behaviour and Sulfone Metabolite Formation. **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p. 524–530, 1 abr. 2011.

KITULAGODAGE, M.; BUTTEMER, W.; ASTHEIMER, L. Adverse effects of fipronil on avian reproduction and development: maternal transfer of fipronil to eggs in zebra finch *Taeniopygia guttata* and in ovo exposure in chickens *Gallus domesticus*. **Ecotoxicology**, 2011.

KOPP, R. et al. Prolonged Hypoxia Increases Survival Even in Zebrafish (*Danio rerio*) Showing Cardiac Arrhythmia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89099, 14 fev. 2014.

KRULL, M.; BARROS, F. Key Issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: A Critical Review. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 2, 2012. Disponível em: <<https://siaiap32.univali.br/seer/index.php/eec/article/view/4021>>. Acesso em: 4 abr. 2022.

LAWRENCE, C. The Husbandry of Zebrafish (*Danio rerio*): A Review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1, p. 1–20, 14 set. 2007.

LI, K. et al. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 171, mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28002765/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

LITTLE, E. E. et al. Behavioral Indicators of Sublethal Toxicity in Rainbow Trout. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 380–385, 1 maio 1990.

LOPES, F. M. et al. Glyphosate Adversely Affects *Danio rerio* Males: Acetylcholinesterase Modulation and Oxidative Stress. **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 97–105, abr. 2017.

MARINHO, J. F. U. et al. Sugar Cane Vinasse in Water Bodies: Impact Assessed by Liver Histopathology in Tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239–245, 1 dez. 2014.

MARTINS, R. X. et al. Exposure to 2,4-D Herbicide Induces Hepatotoxicity in Zebrafish Larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 248, p. 109110, 1 out. 2021.

MENDES, L. B. **O uso de modelos ecossistêmicos e experimentos laboratoriais para avaliação dos efeitos do agrotóxico Mythos® (i.e. pyrimethanil) em ecossistemas aquáticos**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-18022016-130207/>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

MENON, A. G. K. **Check list-fresh water fishes of India**. Calcutta: The Survey, 1999.

MILHOME, M. A. L. et al. **Estudo do nível de exposição por agrotóxicos nos recursos hídricos da região do perímetro irrigado Jaguaribe-Apodi-CE**. Em: XIX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HIDRÍCOS. Maceió/AL: ABRHidro, 2011. Disponível em: <<https://anais.abrhidro.org.br/job.php?Job=11354>>. Acesso em: 04 abr. 2022.

MOREIRA, R. A. et al. Mortality, Spatial Avoidance and Swimming Behavior of Bullfrog Tadpoles (*Lithobates Catesbeianus*) Exposed to the Herbicide Diuron. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 6, p. 125, 18 maio 2019.

MOREIRA, R. A. et al. Fipronil and 2,4-D Effects on Tropical Fish: Could Avoidance Response Be Explained by Changes in Swimming Behavior and Neurotransmission Impairments? **Chemosphere**, v. 263, p. 127972, 1 jan. 2021.

MUTO, A.; KAWAKAMI, K. Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, 2013. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2013.00110>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

NILLOS, M. G. et al. Enantioselectivity in Fipronil Aquatic Toxicity and Degradation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1825–1833, 2009.

NOBONITA, D.; SUCHISMITA, D. Chlorpyrifos toxicity in fish: A Review. **Current World Environment**, v. 8, n. 1, 30 abr. 2013. Disponível em: <<https://www.cwejournal.org/vol8no1/chlorpyrifos-toxicity-in-fish-a-review/>>. Acesso em: 30 mar. 2022.

NOVELLI, A. et al. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 36–40, jan. 2012.

PAMANJI, R. et al. Toxicity Effects of Profenofos on Embryonic and Larval Development of Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 887–897, 1 mar. 2015.

PAULINO, M. G. et al. The Impact of Organochlorines and Metals on Wild Fish Living in a Tropical Hydroelectric Reservoir: Bioaccumulation and Histopathological Biomarkers. **Science of The Total Environment**, v. 497–498, p. 293–306, 1 nov. 2014.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. (Belgrade U. (Yugoslavia) F. of A. Fish Gills as a Monitor of Sublethal and Chronic Effects of Pollution. 1994. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF9550113>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

PRITCHARD, V. L. et al. Shoal Choice in Zebrafish, *Danio rerio*: The Influence of Shoal Size and Activity. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 6, p. 1085–1088, 2001.

QURESHI, I. Z. et al. Exposure to sub-acute doses of fipronil and buprofezin in combination or alone induces biochemical, hematological, histopathological and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Aquatic Toxicology**, v. 179, p. 103–114, 1 out. 2016.

RANDLETT, O. et al. Whole-Brain Activity Mapping onto a Zebrafish Brain Atlas. **Nature Methods**, v. 12, n. 11, p. 1039–1046, 2015.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019.

RUIZ DE ARCAUTE, C.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and Genotoxic Effects of the 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)-Based Herbicide on the Neotropical Fish *Cnesterodon Decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 222–229, 2016.

RUIZ DE ARCAUTE, C.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Synergism of Mixtures of Dicamba and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicide Formulations on the Neotropical Fish *Cnesterodon Decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). **Environmental Pollution**, v. 236, p. 33–39, 1 maio 2018.

SANCHES, A. L. M. **Avaliação do efeito ambiental do inseticida Kraft 36EC® (abamectina) e do fungicida Score 250EC® (difenoconazol) por meio de análises ecotoxicológicas em diferentes estágios de vida do *Danio rerio***. 2018. Universidade de São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-13092018-172144/>>. Acesso em: 12 mar. 2022.

SANTOS, V. S. **Ciclo do Nitrogênio**. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/biologia/ciclo-nitrogenio.htm>>. Acesso em: 2 abr. 2022.

SARIKAYA, R.; SELVI, M. Investigation of Acute Toxicity of (2,4-Dichlorophenoxy)Acetic Acid (2,4-D) Herbicide on Larvae and Adult Nile Tilapia

(*Oreochromis Niloticus L.*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 2, p. 264–268, 1 set. 2005.

SAXENA, K. K.; CHAUHAN, R. R. S. Oxygen Consumption in Fish, *Labeo Rohita* (HAM.) Caused by Distillery Effluent. **Ecology, Environment and Conservation**, v. 9, n. 3, p. 357–360, 2003.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural Preference of Zebrafish (*Danio rerio*) for a Dark Environment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1551–1553, dez. 1999.

SILVA, A. et al. **Ecotoxicidade Da Vinhaça Para o Peixe Mato Grosso (*Hyphessobrycon Eques*) e Para a Macrófita Lentilha d'água (*Lemna Minor*)**. 2015. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Ecotoxicidade-da-vinha%C3%A7a-para-o-peixe-mato-grosso-e-Silva-Carraschi/a9e4d6a198a6a0ba64757f33f16d1aafd7b39f47>>. Acesso em: 2 abr. 2022.

SILVA, L. C. M.; DAAM, M. A.; GUSMAO, F. Acclimation Alters Glyphosate Temperature-Dependent Toxicity: Implications for Risk Assessment under Climate Change. **Journal of Hazardous Materials**, v. 385, p. 121512, 5 mar. 2020.

SPENCE, R. et al. The Distribution and Habitat Preferences of the Zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 5, p. 1435–1448, 2006.

STATSOFT INC. 2004. **Statistica: data analysis software system, version 7**. Tulsa. Disponível em <http://www.statsoft.com/>.

STEHR, C. M. et al. The Developmental Neurotoxicity of Fipronil: Notochord Degeneration and Locomotor Defects in Zebrafish Embryos and Larvae. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 270–278, jul. 2006.

THIEL, N. A. et al. Exposure to the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Impairs Mitochondrial Function, Oxidative Status, and Behavior in Adult Zebrafish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 36, p. 45874–45882, 1 dez. 2020.

TINGLE, C. C. D. et al. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 176, p. 1–66, 2003.

TON, C.; LIN, Y.; WILLETT, C. Zebrafish as a Model for Developmental Neurotoxicity Testing. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 76, n. 7, p. 553–567, 2006.

US EPA, U. S. E. P. A. **ECOTOX Knowledgebase**. Disponível em: <<https://cfpub.epa.gov/ecotox/search.cfm>>. Acesso em: 28 mar. 2022.

VELKI, M. et al. Diuron and Diazinon Alter the Behavior of Zebrafish Embryos and Larvae in the Absence of Acute Toxicity. **Chemosphere**, v. 180, p. 65–76, 1 ago. 2017.

VIANA, N. P. et al. Bioconcentration and Toxicological Impacts of Fipronil and 2,4-D Commercial Formulations (Single and in Mixture) in the Tropical Fish, *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 8, p. 11685–11698, 1 fev. 2022.

VIEIRA, C. E. D. et al. An Integrated Approach in Subtropical Agro-Ecosystems: Active Biomonitoring, Environmental Contaminants, Bioaccumulation, and Multiple Biomarkers in Fish. **Science of The Total Environment**, v. 666, p. 508–524, 20 maio 2019.

VIGÁRIO, A. F.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Effects of the 2,4-D Herbicide on Gills Epithelia and Liver of the Fish *Poecilia Vivipara*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 523–528, jun. 2014.

WANG A, X. et al. Effect of triazophos, fipronil and their mixture on miRNA expression in adult zebrafish. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 45, n. 7, p. 648–657, 28 set. 2010.

WANG, C. et al. A Metabolomic Study of Fipronil for the Anxiety-like Behavior in Zebrafish Larvae at Environmentally Relevant Levels. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 211, p. 252–258, abr. 2016.

WU, H. et al. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 9–14, 1 out. 2014.

YANCHEVA, V. et al. Fish in Ecotoxicological Studies. **Ecologia Balkanica**, v. 7, p. 149–169, 1 jun. 2015.

YANG, C. et al. Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. **ISRN Ecology**, v. 2011, p. e130289, 31 out. 2011.

ZAHANGIR, M. **Effect of pH as a stressor on the stress responses in zebrafish (*Danio rerio*)**. [Dissertação de mestrado] Bangladesh Agricultural University, 2014.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, mediante a exposição de representantes dos grupos de produtores primários, consumidores primários e consumidores secundários, avaliou-se a toxicidade de dois agrotóxicos comumente utilizados na cultura de cana-de-açúcar do país, além da vinhaça, um resíduo proveniente da destilação do etanol. Esta avaliação incluiu a mensuração de efeitos letais, subletais e de pós-exposição, tanto dos compostos isolados quanto de suas misturas, envolvendo aspectos morfológicos, fisiológicos, comportamentais e reprodutivos dos indivíduos e suas possíveis consequências na população de cada uma das espécies.

Com relação à toxicidade, para os experimentos laboratoriais, verificou-se que a vinhaça e a mistura dela com os agrotóxicos foram os tratamentos mais tóxicos, com efeito letal para 100% dos organismos quando expostos às concentrações ambientalmente realísticas, como aquelas registradas em diversos corpos de água do Estado de São Paulo pela CETESB (2018). Com estes resultados seria possível afirmar que a vinhaça poderia desestabilizar os três primeiros níveis tróficos de um ambiente de um sistema aquático em uma proporção de 1,3 % V/V ou superior. Os experimentos de semi-campo, por outro lado, não mostraram resultados significativos dos tratamentos em comparação ao controle no crescimento populacional e nos parâmetros fisiológicos da alga *R. subcapitata*. Estes resultados mostram a importância das avaliações de semi-campo como os mesocosmos, a partir da complexidade da composição do meio e das interações entre os organismos que podem ocorrer. Apesar da grande variabilidade que um experimento em mesocosmo apresenta, os resultados gerados estão mais próximos da realidade em campo. A mesma ausência de efeitos foi observada para fipronil, tanto em laboratório como em campo, e para 2,4-D em doses ambientalmente realísticas, apresentando um valor tóxico distante do que é encontrado nos sistemas naturais (ver CETESB, 2018).

Então, seria correto afirmar que as três substâncias presentes no ambiente não trariam risco para a população de *R. subcapitata*? A composição da vinhaça apresenta elevado nível de nitrogênio e fósforo, além de uma série de nutrientes essenciais para o crescimento de algas e plantas. Um ambiente perturbado por excesso de nutrientes e alta demanda química e biológica de oxigênio, aumenta a competição interespecífica, com diminuição das mais vulneráveis e dominância das espécies mais tolerantes e/ou invasoras. Por exemplo, o descarte de efluentes com características de elevado nível de nutrientes, DQO e DBO, como a vinhaça, favorece o florescimento de cianobactérias e espécies dominantes de macrófitas que podem provocar eutrofização em ecossistemas naturais (CARPENTER et al., 1998). A eutrofização é um

problema sério e constante de regiões populosas, e além da redução da biodiversidade de produtores primários pode provocar mortandade de peixes e outros organismos pela diminuição brusca de oxigênio do meio. Além disso, podem ocorrer espécies de cianobactérias com potencial de introduzir toxinas perigosas para a saúde do ecossistema e da população (CARPENTER, 1981). Então, pode-se presumir que *R. subcapitata* não teria sua população totalmente sem risco em um ambiente contaminado pela vinhaça e pelos agrotóxicos testados.

Além disso, apesar da vinhaça não ter prejudicado à alga em mesocosmos, ela foi extremamente tóxica para *C. silvestrii* e *D. rerio* nos experimentos realizados em mesocosmos. Os consumidores primários, como *C. silvestrii*, se alimentam dos produtores primários, e a ausência de espécies consumidoras para um grupo pode fazer este grupo aumentar exponencialmente. Além disso, assim como para as algas, a eliminação de espécies sensíveis do ambiente pode favorecer outras espécies de consumidores primários e tornar o ambiente menos diverso, ou no pior dos cenários, monoespécie (THOMPSON et al., 2012; LEITE, 2020). O mesmo pode ocorrer para os próximos níveis de consumidores como *D. rerio*. A ausência de pequenos peixes pode reduzir a disponibilidade de alimento para os níveis superiores e sem alimento, a aptidão das espécies é reduzida, como por exemplo, taxa de reprodução, comportamentos de fuga de predadores ou ambientes inóspitos (BARLETTA; LIMA, 2019). Em resumo, conclui-se que a vinhaça é um resíduo extremamente tóxico para *C. silvestrii* e *D. rerio*, seja isolada ou em mistura com os agrotóxicos, e com grande potencial de alterar a comunidade de produtores primários, consumidores primários e secundários devido a sua composição e interferências em parâmetros como pH, oxigênio dissolvido, salinidade e concentração de nutrientes do meio.

No caso dos agrotóxicos, 2,4-D e fipronil tiveram resultados distintos. Para *C. silvestrii* o herbicida não interferiu em nenhum *endpoint* avaliado em concentrações ambientalmente realísticas, no entanto, vale lembrar que os experimentos realizados no presente trabalho foram de curta duração e sem análise molecular envolvida, sendo assim, não é possível excluir a possibilidade de efeitos a longo prazo, multigeracionais ou celulares/genéticos. Assim, seria importante esta avaliação em estudos futuros. Para *D. rerio*, assim como para o cladóceros, o herbicida não causou mortalidade em doses relevantes, mas influenciou os resultados do teste de mistura e teve efeitos sutis no comportamento e na histologia das brânquias, com efeito mais pronunciado no teste de alimentação realizado em laboratório, mas não com os animais expostos em mesocosmos. Por outro lado, na literatura o herbicida 2,4-D é mencionado por causar alterações nos sistemas nervoso central, cardiovascular e hepático, principalmente em embriões. Dehnert et al. (2019), por exemplo, reforçam que o impacto de 2,4-D nas larvas de

peixes juntamente com outros estressores, como mudanças de temperatura, poluição adicional e perda de habitat, podem diminuir a aptidão de espécies de peixes em lagos de água doce e interferir na dinâmica do ecossistema. A literatura existente sobre os efeitos de *D. rerio* sugere que o uso de formulações de herbicidas com 2,4-D em ambientes aquáticos exige cautela e fiscalização, visto seus efeitos subletais para consumidores secundários como *D. rerio*. No Brasil, o herbicida 2,4-D ocupa o segundo lugar no *ranking* de agrotóxicos mais vendidos, com cerca de 57 mil toneladas de ingrediente ativo comercializados em 2020, com aproximadamente 10 % desse valor só no estado de São Paulo (IBAMA, 2020).

Em relação ao fipronil, pode-se concluir que este inseticida representa um risco eminente para a sobrevivência de populações de crustáceos sensíveis, como *C. silvestrii*, e de pequenos peixes, como *D. rerio*. No caso de *C. silvestrii*, as concentrações que começam a interferir na reprodução e causam imobilidade foram de 0,8 e 2,0 µg/L, respectivamente. Sendo assim, na hipótese da presença da espécie em um corpo d'água de detecção de fipronil entre 2,4 e 465 µg/L, como a realizada pela CETESB (2018), esta espécie estaria em sério risco de ser extinguida do sistema a curto ou longo prazo, dependendo da concentração. Para *D. rerio*, apesar de os valores de  $CL_{10-96\text{ h}} = 136\text{ }\mu\text{g/L}$  e  $CL_{50-96\text{ h}} = 172\text{ }\mu\text{g/L}$  serem maiores que para *C. silvestrii*, eles ainda estão dentro da faixa de concentrações detectadas no ambiente. Além disso, deve-se mencionar que em grande parte dos experimentos foram observados efeitos comportamentais e histológicos em alguns indivíduos em todas as amostragens com fipronil, com o mais grave sendo a curvamento da coluna vertebral, e com os animais não se recuperando após sete dias de transferência para meio não contaminado. Fipronil já teve sua presença detectada diversas vezes em corpos d'água próximos a cultivos agrícolas no país (GRÜTZMACHER et al., 2008; MARCHESAN et al., 2010; SILVA et al., 2011; CETESB, 2018, 2019) e sua alta toxicidade observada em espécies nativas (PINTO et al., 2021a, 2021b; SILVA et al., 2021), além de cerca de 1100 dados presentes em base de dados internacional (US EPA, 2022), com avaliações de toxicidade para diversas espécies. Este inseticida foi banido pela União Européia em 2017 (ERICKSON, 2018) e tem concentrações máximas definidas em corpos d'água de 0,1 µg/L por agências regulamentadoras internacionais (CETESB, 2019). Recentemente, uma portaria publicada pelo governo federal (PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021) definiu que as concentrações de fipronil em água de consumo humano devem ser no máximo até 1,2 µg/L. Esta concentração é suficiente para interferir em espécies presentes nos corpos d'água brasileiros (SILVA et al., 2020; PINTO et al., 2021a), além de estar abaixo do que já foi detectado em locais próximos de campos agrícolas (MARCHESAN et al., 2010; CETESB, 2018). Adicionalmente, fipronil é um dos inseticidas mais



comercializados no país, com aproximadamente 2 mil toneladas de ingrediente ativo vendido no país em 2020, sendo cerca de 25 % vendido somente no estado de São Paulo (533 toneladas) (IBAMA, 2020). Em um cenário de alta produção agrícola e afrouxamento das políticas ambientais, como está ocorrendo no Brasil nos últimos anos, o fipronil representa um grande risco para a biodiversidade e o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos.

Neste sentido, este trabalho colabora com a disponibilização de dados significativos que podem contribuir para as avaliações em espécies nativas, como *C. silvestrii*, e com maior representatividade em sistemas aquáticos brasileiros, além de aumentar o conhecimento científico sobre o impacto de substâncias que estão associadas ao cultivo de cana-de-açúcar, como a vinhaça e os agrotóxicos estudados. Espera-se, ainda, que essa pesquisa possa colaborar para uma futura discussão sobre a reavaliação do uso e regulação de fipronil em um cenário agrícola que somente tende a crescer nos próximos anos.

## Referências

BARLETTA, M.; LIMA, A. R. A. Systematic Review of Fish Ecology and Anthropogenic Impacts in South American Estuaries: Setting Priorities for Ecosystem Conservation. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2019.00237>>. Acesso em: 5 abr. 2022.

CARPENTER, S. R. Submersed Vegetation: An Internal Factor in Lake Ecosystem Succession. **The American Naturalist**, v. 118, n. 3, p. 372–383, 1981.

CARPENTER, S. R. et al. Nonpoint Pollution of Surface Waters with Phosphorus and Nitrogen. **Ecological Applications**, v. 8, n. 3, p. 559–568, 1998.

CETESB, C. A. D. S. P. **Diagnóstico da contaminação de águas superficiais, subterrâneas e sedimentos por agrotóxicos**. Disponível em: <[https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2020/03/Relatorio-Agrot%C3%B3xicos\\_28\\_11\\_2019\\_Conclu%C3%ADdo\\_PDF-1.pdf](https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2020/03/Relatorio-Agrot%C3%B3xicos_28_11_2019_Conclu%C3%ADdo_PDF-1.pdf)>. Acesso em: 5 abr. 2022.

CETESB, C. A. do estado de S. P. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017**. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2018/06/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-das-%C3%81guas-Interiores-no-Estado-de-S%C3%A3o-Paulo-2017.pdf>>. Acesso em: 5 abr. 2022.

ERICKSON. **Fipronil blamed for historical bee deaths**. Disponível em: <<https://cen.acs.org/environment/pesticides/Fipronil-blamed-historical-bee-deaths/96/web/2018/12>>. Acesso em: 5 abr. 2022.

GRÜTZMACHER, D. D. et al. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, p. 632–637, dez. 2008.

IBAMA, I. B. do M. A. e dos R. N. R. **Boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LEITE, M. B. A. **Impactos, recuperação e conservação de ecossistemas aquáticos. Ambientebrasil - Ambientes**, 21 dez. 2020. Disponível em: <[https://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/artigos\\_agua\\_doce/impactos\\_recuperacao\\_e\\_conservacao\\_de\\_ecossistemas\\_aquaticos.html](https://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/artigos_agua_doce/impactos_recuperacao_e_conservacao_de_ecossistemas_aquaticos.html)>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MARCHESAN, E. et al. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053–1059, maio 2010.

PINTO, T. J. da S. et al. Functional Responses of *Hyalella Meinerti* after Exposure to Environmentally Realistic Concentrations of 2,4-D, Fipronil, and Vinasse (Individually and in Mixture). **Aquatic Toxicology**, v. 231, p. 105712, 1 fev. 2021a.

PINTO, T. J. da S. et al. Impact of 2,4-D and Fipronil on the Tropical Midge *Chironomus Sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, p. 111778, 1 fev. 2021b.

SILVA, D. R. O. da et al. Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado. **Química Nova**, v. 34, p. 748–752, 2011.

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**, 29 ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10646-020-02275-4>>. Acesso em: 31 ago. 2020.

SILVA, L. C. M. et al. Lethal and Sublethal Toxicity of Pesticides and Vinasse Used in Sugarcane Cultivation to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 241, p. 106017, dez. 2021.

THOMPSON, R. M. et al. Food Webs: Reconciling the Structure and Function of Biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 12, p. 689–697, 1 dez. 2012.