

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

MARIA HELENA VIANA CARRASCOSSI

Alterações no ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*, expostos a sedimentos de córregos localizados em áreas de cultivo de cana-de-açúcar

Versão corrigida

São Carlos

2021

MARIA HELENA VIANA CARRASCOSSI

Alterações no ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*, expostos a sedimentos de córregos localizados em áreas de cultivo de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Juliano José Corbi

São Carlos- SP

2021

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.

C614a Carrascossi, Maria Helena
Alterações no ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*, expostos a sedimentos de córregos localizados em áreas de cultivo de cana-de-açúcar / Maria Helena Carrascossi; orientador JULIANO CORBI. São Carlos, 2021.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2021.

1. Cultivo de Cana-de-açúcar. 2. Ecotoxicologia.
3. *Chironomus sancticaroli*. 4. Biomonitoramento.. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **MARIA HELENA VIANA CARRASCOSSI**.

Título da dissertação: "Alterações no ciclo de vida de *Chironomus sanctificaroli*,
expostos a sedimentos de córregos localizados em áreas de cultivo de cana-
de-açúcar".

Data da defesa: 18/11/2021.

Comissão Julgadora

Resultado

Prof. Associado **Juliano Jose Corbi**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

APROVADA

Profa. Dra. **Aline Redondo Martins**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Ilha Solteira)

APROVADA

Prof. Dr. **Fernando Perloff**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e
Saneamento:
Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

AGRADECIMENTOS

Gratidão, 3 sílabas de uma palavra muito generosa derivada do latim “gratia” – “graça” ou “gratus” – agradecer. Por que nos parece ser mais fácil reclamar do que agradecer? Por que temos uma certa tendência a ficarmos insatisfeitos e a achar que estamos muito longe de tudo aquilo que sonhamos e podemos?

Realmente se lançar num novo terreno, sair da zona de conforto quando tudo parece estar organizado, é desafiador ainda mais quando você e o mundo passam por uma pandemia que modifica todo o curso natural do seu sonho.

Aprendi com isso tudo a ter orgulho do que sou, do que faço e do que tenho. Aprendi a ser menos crítica e menos cruel comigo, sabendo relevar as minhas falhas e fraquezas e celebrar as pequenas conquistas diárias. Os nossos dias são feitos de pequenos passos e é com o sucesso dos pequenos passos que vamos chegar onde queremos.

E é com este olhar generoso sobre mim e sobre toda a minha vida que eu agradeço a Deus tudo o que eu conquistei até hoje. Eu reconheço o meu esforço e me reconcilio com os meus fracassos, porque hoje sei que nenhum deles foi grande o suficiente para me fazer desistir. Pelo contrário, os meus erros me ajudaram a crescer.

Agradeço a Deus pela vida que me proporciona, pela saúde que me presenteou, por ser minha base em dias difíceis, e minha força para vencer sempre todos os desafios da vida.

Agradeço ao meu Querido Companheiro Amado Henrique Luiz Carrascossi, e aos meus Tão Sonhados filhos Francisco e Maria Clara, por sempre estarem ao meu lado me apoiando e me ajudando todos os dias.

Ao Professor Orientador Juliano Corbi, que se tornou um amigo durante essa jornada de estudo, me dando a oportunidade de realizar esse sonho, facilitando o caminho cada vez mais na construção do conhecimento.

Aos meus amados pais Ana Maria Raphael Vicente Viana de Souza (in memoriam) e ao meu Pai Claudio Viana de Souza, que me deram a vida.

Aos meus amados irmãos que sempre torceram por minhas conquistas Claudio Eduardo Viana de Souza (in memoriam) e ao meu Tato Danilo Prado Viana de Souza, que está sempre comigo, que torna tudo mais fácil.

A Dona Aparecida Pichioni, que me auxiliou cuidando dos meus filhos nos momentos que precisei me ausentar, com todo carinho e amor que nos ofereceu, mais que uma funcionária, uma avó e amiga para meus filhos e para minha família, em vários momentos a referência materna que me faz tanta falta.

Ao Vítor Guerreiro que durante esse tempo que estive estudando, se dedicou em vir brincar e fazer exercícios com meus filhos, de forma divertida e prazerosa.

A todos os meus professores de forma abrangente, desde o meu primário até hoje, que fizeram parte da minha formação, todos são importantes responsáveis pelo caminho percorrido até hoje, inclusive os que fizeram parte de minha formação espiritual, seria injusto apontar alguns nomes nesse momento, todos possuem e possuíram uma enorme importância na construção do eu.

A todos os meus amigos do Laboratório que sempre me ajudaram com gentileza e generosidade no âmbito acadêmico, indispensáveis nessa jornada, Bruna, Aline, Fernanda, Lídia, Gleyson, Daniel, Hugo e Mayara (grupo LEAA).

Gratidão em especial ao trio Força Tarefa, que em momentos de desespero, e muita insegurança me auxiliaram com muita boa vontade, generosidade rara em dias tão complexos, Aline Bernegossi, Bruna Nayara e Fernanda Pinheiro (LEAA), desejo a vocês o mais lindo do Universo.

A amiga Renata Lombardi, que me ajudou nos estudos desde o início para a prova de mestrado, me dando força, inspiração, coragem e companheirismo na vida.

A amiga irmã Cibele Repele Duch, presente caro que Deus enviou, que sempre me inspirou, e me impulsionou a querer sempre mais.

A todas as minhas amigas irmãs, que até hoje estão ao meu lado me inspirando e me acompanhando de maneira divertida e assídua Aline Martins, Daniela Luz, Mirela Pupim, Tatiane Zaccaro, Lize Cruz, Marcela Sávio, Caroline Cambiaghi, Mayara Yamashiro e Miriam Azevedo.

A Dalvani Aparecida Lombardi, Elizabete Pastre Viana de Souza, Cátia Guerreiro, Rosa Maria Machado e Fátima Cincerre pelas orações.

Aos amados (in memoriam) que me foram tão caros, e importantes em minha vida, e hoje sigo com seus ensinamentos, minha avó Almira Dias de Souza ao meu tio Antônio Viana de Souza, a minha prima Ana Paula Raphael Vicente Carrascossi.

A minha Tia e Madrinha Isaura Viana de Souza, e a minha avó Deus Lyra Raphael Vicente, que fizeram parte de minha vida, e me apoiaram em tempos difíceis.

A Família Carrascossi (Devanil e Ivanir, Luís e Rita, Fábio e Elaine) que me auxiliaram em dias que precisei que buscassem meus filhos na escola, ou levasse-os em alguma atividade.

A minha querida tia Ermelinda Gonçalves da Rocha e ao Tio Marcos Gonçalves da Rocha, que sempre torceram por minhas conquistas.

Ao Luiz Aparecido Joaquim (UFSCar) que nos ajudou nas coletas de forma intensa.

A Sá e a Priscila do departamento de hidráulica e saneamento da USP- São Carlos.

Ao amigo Wagner pela amizade e ensinamentos, sem amigos não somos nada.

Ao meu amigo e Professor de Inglês Charles Valadão, que está nessa jornada comigo desde o início, indispensável nesse momento, nesse processo de muito crescimento intelectual.

A minha Professora de yoga Flávia Altimari do Estúdio de Yoga Transcender, que tem me ajudado a respirar nessa fase de extrema ansiedade.

Ao apoio recebido de Cintia Maria da Costa Duarte (Microterra) pela ajuda e paciência.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior- Capes.

Agradeço aos meus companheiros Espirituais nessa Jornada tão rica e trabalhosa que é a vida, São Francisco de Assis, Santa Clara de Assis, Santa Catarina de Alexandria, São Thomas de Aquino e ao meu tão Amado Irmão Jesus e Nossa Mãe Maria...

Enfim agradeço tudo e todos que de alguma maneira proporcionaram algum tipo de crescimento para minha evolução, que neste singelo texto não seja ingrata esquecendo de ninguém, a grande verdade que cada um que passou em meu caminho me trouxe crescimento e aperfeiçoamento e guardo em meu coração.

Em meio a pandemia no qual estamos vivendo, ressignificar a vida, os valores, é algo indispensável e inadiável, o que realmente importa para você? O que você realmente almeja do fundo de seu coração? Cada um possui uma resposta.

Aspiro uma vida leve, com meus pés descalços na terra, com o sol sobre meus cabelos, o vento em meu rosto, minha família ao meu lado e muitos animais no meu entorno, pessoas de bem, simples e verdadeiras, com seus egos minimizados e seu amor exacerbado, almejo mais que tudo desacelerar, a simplicidade de aprender vivendo os dias que Deus me dá com alegria, plenitude, cautela e leveza. Que eu consiga influenciar as pessoas ao meu redor por boas práticas de conservação a vida, ao planeta. E a competitividade do mundo? Essa eu me despeço aqui. E que eu prossiga nessa metamorfose ambulante!

Maria Helena Viana Carrascossi (2021)

RESUMO

VIANA-CARRASCOSSI, M. H. 2022. Alterações no ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*, expostos a sedimentos de córregos localizados em áreas de cultivo de cana-de-açúcar. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Em razão do aumento da população humana, o cultivo de monoculturas como a cana-de-açúcar vem ascendendo para a fabricação de etanol, açúcar entre outros. Nos seus cultivos, destacam-se o desmatamento florestal e a utilização de agrotóxicos e fertilizantes, que têm o propósito de repelir ou eliminar alguma forma de vida indesejável, que possa oferecer riscos à agricultura. Dessa forma, há uma grande preocupação no espectro ambiental, pois esses agroquímicos oferecem riscos toxicológicos para a biota terrestre de forma geral, atingindo diferentes níveis tróficos e alcançando a população humana. Muitos organismos estão sendo utilizados como indicadores naturais do impacto nesses ambientes, com alto nível de toxicidade, também conhecido como biomonitoramento. Diversos estudos vêm observando deformidades em muitos organismos que vivem expostos a esses ambientes impactados, tais como deformidades no aparelho bucal, alterações nos processos naturais de reprodução, variação na morfometria das asas de insetos e alterações no ciclo de vidas das espécies. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência do cultivo da cana-de-açúcar em córregos e seus efeitos para o ciclo de vida da espécie *Chironomus sancticaroli*, em ensaios de laboratório. Foram realizadas 3 coletas de sedimento em sete córregos, sendo quatro localizados em áreas adjacentes ao cultivo de cana-de-açúcar e três em áreas com mata ciliar preservada, para a realização de testes de geração com *Chironomus sancticaroli*. Larvas de I instar foram expostas de forma contínua aos sedimentos coletados até completarem seu ciclo de vida durante duas gerações, em laboratório. Foram coletadas larvas de uma réplica de cada ensaio para avaliar o comprimento larval, organismos adultos para avaliação de ciclo de vida, além de ter sido preparado lâminas de asas para verificar seu tamanho e fecundidade. As variáveis físicas e químicas dos córregos apresentaram valores diferentes entre os ambientes estudados. Em relação ao oxigênio dissolvido os córregos adjacentes a cana-de-açúcar possuem concentrações mais baixas em relação a córregos com a mata ciliar preservada, esse resultado pode ter influência da temperatura dos córregos, pois quanto maior a temperatura da água, menos oxigênio dissolvido possui, sendo assim a mata ciliar propicia maior oxigenação de um córrego. O

pH foi semelhante em todos os córregos. Em locais com a cultura açucareira mostraram alto grau de condutividade, em relações a córregos menos impactados ou com mata ciliar preservada. No geral, os córregos localizados em áreas agrícolas apresentaram indício de poluição quando comparados as áreas preservadas, por outro lado, os dados obtidos pelos ensaios Ecotoxicológicos não apresentaram diferenças entre os ambientes estudados.

Os resultados mostraram que os comprimentos das larvas da segunda geração, foram inferiores ao da geração parental, com exceção de dois córregos, Chibarro e Espriado, que apresentaram comprimento superior ao do grupo controle. O comprimento das asas das fêmeas na segunda geração foi maior em córregos de cana-de-açúcar e menor em áreas com a mata ciliar preservada. A emergência de adultos observadas foram semelhantes para parental e segunda geração, com exceção do córrego Água sumida que apresentou um crescimento no percentual de emergência para geração 2. A fecundidade observada mostrou que a produção de ovos foi maior na segunda geração nos córregos de cana-de-açúcar (Água Sumida, Água Preta e Chibarro). Observou-se também que o Córrego São João apresentou alto grau de toxicidade e não houve sobrevivência de organismos.

Palavras-chave: Cultivo de Cana-de-açúcar. *Chironomus sancticaroli*. Ecotoxicologia. Biomonitoramento.

ABSTRACT

VIANA-CARRASCOSSI, M. H. 2022. Changes in the life cycle of *Chironomus sancticaroli* exposed to sediments from streams located in sugarcane cultivation areas. Dissertation (Master's degree). São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2021.

The uncontrolled increase in human population, the cultivation of monocultures such as sugarcane has been increasing for the manufacture of ethanol, sugar, among others. For its cultivation, forest clearing, and the use of pesticides stand out, with the purpose of repelling or eliminating some undesirable form of life that could pose risks to agriculture. Thus, there is a great concern in the environmental spectrum, as these agrochemicals offer toxicological risks to the terrestrial biota, reaching trophic levels and reaching the human population. Many organisms are being used as natural indicators of the impact suffered in these environments, with a high level of toxicity, also known as biomonitoring. Several studies have observed deformities in many organisms that live exposed to these impacted environments, such as deformities in the oral system, alterations in natural reproduction processes, variation in insect wing morphometry and alterations in the life cycle of species. This work aimed to evaluate changes in the life cycle of the aquatic insect species *Chironomus sancticaroli* exposed to sediment from streams located in sugarcane cultivation areas. For this, 3 sediment collections were carried out in seven streams, four located in areas adjacent to sugarcane cultivation and three in areas with preserved riparian forest, in São Carlos and region, to carry out generation tests with *Chironomus sancticaroli*. Instar larvae were continuously exposed to the collected sediments until they completed their life cycle for two generations. Larvae were collected from a replica of each trial, adults were collected for life cycle assessment, and wing blades were prepared to verify their size and fecundity. The physical and chemical variables of the streams presented different values among the studied environments. In relation to dissolved oxygen, streams adjacent to sugarcane have lower concentrations compared to streams with preserved riparian forest, this result may have influence from stream temperature, because the water with higher temperature, the less dissolved oxygen it has, so the riparian forest provides greater oxygenation of a stream. The pH was similar in all streams. In places with sugar culture they showed a high degree of conductivity, in relation to streams less impacted or with preserved riparian forest. In general, streams located in agricultural areas showed evidence of pollution when compared to preserved areas, on

the other hand, the data obtained by Ecotoxicological tests did not show differences between the studied environments. The results showed that the size of larvae in the second generation were smaller than in the parental generation, with the exception of two streams, Chibarro and Espraiado, which were larger than the control group. For female wing length, the second generation showed a longer length in sugarcane streams and a shorter length in the preserved forest. The emergence of adults observed were similar for the parental and second generation, with only the exception of the Água Sumida, which showed an increase in the percentage of emergence for generation 2. The observed fecundity showed that egg production was higher in the second generation in sugarcane streams (Água Sumida, Água Preta and Chibarro). It was also observed that Córrego São João presented a high degree of toxicity and there was no survival of organisms.

Keywords: Sugarcane cultivation. *Chironomus sancticaroli*. Ecotoxicology. Biomonitoring.

Lista de Figuras

Figura 1- Molécula da água	24
Figura 2- Exemplo de ecossistema aquático, Córrego Anhumas, situado no município de Américo Brasiliense	28
Figura 3 - Plantação de cana-de-açúcar	32
Figura 4 - Estágios de vida de <i>Chironomus sancticaroli</i> . A: Massa Ovígera; B: Larva; C: Pupa; D: Adulto Macho e E: Adulto Fêmea.....	35
Figura 5 - Ciclo de vida de <i>Chironomus sancticaroli</i>	36
Figura 6- a) Primeira fase do trabalho: atividade de campo; b) Segunda fase do trabalho: atividade de laboratório, teste de geração.....	38
Figura 7- Mapa mostrando a Bacia do rio Tietê-Jacaré com a localização dos córregos estudados	39
Figura 8- a) e b); Vista geral do Córrego Água Sumida.....	40
Figura 9- a) Vista geral do Córrego São João; b) Coleta de amostras de sedimento no córrego São João.....	41
Figura 10- a) Vista geral do Córrego Chibarro; b) Análise de parâmetros físicos e químicos da água	41
Figura 11- a) e b) Vista geral do Córrego Espreado.....	42
Figura 12- a) e b) Vista geral do Córrego Anhumas	43
Figura 13- a) Córrego São Vicente, leitura dos parâmetros físicos e químicos da água, b) Vista geral do Córrego São Vicente.	43
Figura 14- Vista geral do Córrego Água Preta, mostrando a presença de macrófitas aquáticas	44
Figura 15- Sonda multiparâmetros da marca da marca AKSO	45
Figura 16 - Pá utilizada na coleta, pote plástico de 500 ml para armazenar sedimento e pisseta em polietileno para água 500 ml, com água deionizada para a limpeza das sondas do aparelho medidor de multiparâmetros	46
Figura 17 - Draga de Ekman, coletando sedimento no Córrego Chibarro	46
Figura 18 - Gaiolas de cultivo de <i>Chironomus sancticaroli</i>	47
Figura 19 - Teste de geração: a) pote de 500 ml, b) larvas de I instar, c) sedimento, d) água deionizada, e) emergência de adultos, f) desova, g) montagem da geração seguinte e h) amostragem de larvas	48
Figura 20 - Pesagem do sedimento.....	49
Figura 21 - Pote adaptado para os ensaios.....	50

Figura 22 - Teste de geração.....	50
Figura 23- a) Desova de <i>Chironomus sancticaroli</i> coletada dos ensaios b) Desova coletada e pronta para aerar, aguardando sua eclosão para os ensaios	51
Figura 24- Larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i>	51
Figura 25 – a) Lupa eletrônica, coloração e remoção das asas, b) Seringas utilizadas na remoção das asas	53
Figura 26- a) <i>Chironomus sancticaroli</i> corado com corante ácido fucsina; b) <i>Montagem das lâminas</i>	54
Figura 27 - Medição do comprimento de asas da fêmea de <i>Chironomus sancticaroli</i> com a utilização de lente graduada.....	55
Figura 28 - Larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> , com 12º dias	55
Figura 29- Dados sobre a precipitação total na primavera	58
Figura 30- Dados sobre a precipitação total no verão	58
Figura 31- Dados sobre a precipitação total no outono	59
Figura 32- Valores médios e desvios padrões das concentrações de oxigênio dissolvido nos córregos.....	61
Figura 33- Valores médios e desvios padrões de pH (potencial Hidrogeniônico) nos córregos	61
Figura 34- Valores médios e desvios padrões da condutividade elétrica nos córregos .	62
Figura 35- Valores médios e desvios padrões da temperatura nos córregos.....	62
Figura 36- Valores médios e desvios padrões do comprimento das larvas <i>Chironomus sancticaroli</i> na geração parental e segunda geração	63
Figura 37 - Valores médios e desvios padrões do comprimento da asa da fêmea de <i>Chironomus sancticaroli</i> na geração parental e segunda geração.....	65
Figura 38- Valores médios e desvios padrões da Fecundidade da fêmea de <i>Chironomus sancticaroli</i> na geração parental e segunda geração	66
Figura 39- Valores médios e desvios padrões da Emergência de adultos de <i>Chironomus sancticaroli</i> na geração parental e segunda geração	68

Lista de tabelas

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na realização do teste de gerações	52
Tabela 2 - Variáveis físicas e químicas da água: valores médios de pH, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido	57

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. ÁGUA E OS AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS	23
2.2. ECOSISTEMAS AQUÁTICOS	26
2.3. A CANA-DE-AÇÚCAR E O USO DE AGROTÓXICOS	28
2.4. A ECOTOXICOLOGIA COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISES AMBIENTAIS	32
2.5. <i>CHIRONOMUS SANCTICAROLI</i> COMO ORGANISMO-TESTE	34
3. OBJETIVOS	37
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. ÁREA DE ESTUDO	39
4.1.1. <i>Córrego Água Sumida</i>	40
4.1.2. <i>Córrego São João</i>	40
4.1.3. <i>Córrego Chibarro</i>	41
4.1.4. <i>Córrego Espraiado</i>	42
4.1.5. <i>Córrego Anhumas</i>	42
4.1.6. <i>Córrego São Vicente</i>	43
4.1.7. <i>Córrego Água Preta</i>	44
4.2. VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA	44
4.3. COLETA DE SEDIMENTO	45
4.4. CULTIVO DE <i>CHIRONOMUS SANCTICAROLI</i>	46
4.5. TESTE DE GERAÇÃO UTILIZANDO SEDIMENTO	47
4.6. COMPRIMENTO DAS ASAS E FECUNDIDADE POTENCIAL	52
4.7. COMPRIMENTO DAS LARVAS	55
4.8. EMERGÊNCIA DE ADULTOS	56
4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA	57
5.2. TESTE DE GERAÇÕES	63
5.2.1. <i>Comprimento das larvas</i>	63
5.2.2. <i>Comprimento da asa e fecundidade</i>	64
5.2.3. <i>Emergência de adultos</i>	67
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar merece destaque, por ser matéria prima de um biocombustível, do ponto de vista energético para a produção de etanol de primeira geração, apresentando vantagens econômicas e ambientais (SCHIESARI; CORRÊA, 2015; UNICA, 2021), porém é responsável como muitas outras interferências humanas sobre o meio ambiente. A cana-de-açúcar recebe cada vez mais atenção devido ao impacto ambiental que vem ocorrendo para todos os sistemas, aquáticos, florestais, e toda sua biota de forma abrangente. Com crescimento descontrolado da urbanização, industrialização e da população, conseqüentemente a necessidade do crescimento agrícola vem se expandindo cada vez mais no Brasil, e o aumento populacional descontrolado ao longo dos anos, acarreta a alta demanda alimentícia, promovendo a destruição de recursos naturais, como a cobertura florestal nativa, representada por variados biomas, qualidade da água subterrânea, substrato de recursos hídricos, é algo preocupante e com conseqüências muitas vezes irreversíveis (RODRIGUES;CORBI, 2006; SAULINO, 2012).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com cerca de 665,1 milhões de toneladas processadas na safra 2020/2021 (AGEITEC, 2019). A agricultura moderna, é diretamente dependente de substâncias agroquímicas, que estão associadas a resistência genética da planta, diminuindo assim o efeito dos pesticidas, tornando as resistentes a essas substâncias sintetizadas, causando desequilíbrios do ecossistema, novas pestes, persistência biológica, tudo isso para fornecer para agricultores e consumidores custo acessível (RAMOS; GONZÁLEZ; RAMOS, 2004; ARENAS et al., 2006; VIGNA et al., 2006).

Com toda essa produção de cana-de-açúcar, nossos recursos florestais vêm sendo destruídos, inclusive a vegetação ripária de extrema importância, que funciona como um bloqueio de substâncias indesejadas como certos poluentes, agindo como um “filtro” em um rio, pois sua existência em áreas em torno de plantios agrícolas próximas a recursos hídricos, dificultam a entrada de pesticidas, herbicidas e fertilizantes, utilizados na monocultura (cana-de-açúcar como exemplo), para dentro do rio como calhas de poluentes. Quando essa mata ciliar é ausente, todo esse poluente que entra dentro dos córregos, ficam diretamente acumulados no substrato desse local, interferindo assim em toda a biota da comunidade de macroinvertebrados inseridos nesse habitat (SHORTLE et al., 2001, EMBRAPA, 2004). A biota aquática, tem como característica mostrar variadas

perturbações nas condições ambientais em um rio, através de alterações em seu padrão de desenvolvimento (Rosenberg; Resh, 1993).

Existem leis que regulamentam e fiscalizam o registro de agrotóxicos no Brasil (Portaria Normativa IBAMA nº 84/1996), determinando a obrigatoriedade de testes de toxicidade em organismos aquáticos, como exemplo peixes e macroinvertebrados, em que se exigem testes de bioacumulação, ensaios crônicos e agudos. Esses organismos mostram que são relevantes bioindicadores da contaminação aquática, em avaliações toxicológicas e em ensaios de biomonitoramento ambiental, pelo conjunto de características que possuem: ciclo de vida na água, fácil captura com equipamentos específicos e longevidade. Algumas espécies de fácil manuseio e cultivo em biotérios constituem papel importante na cadeia alimentar no ambiente aquático, refletindo o estado do ecossistema como um todo (Arana et al., 2017).

Estudos vêm mostrando que as concentrações de metais Cd, Cu, Pb, Mn, Ni e Zn, oriundos de fertilizantes utilizados na atividade canavieira, tem impactado os recursos hídricos adjacentes a essas áreas, inclusive foram encontradas concentrações desses metais em larvas de insetos aquáticos (Corbi et al., 2019). A alta concentração desses metais, não essenciais aos organismos, são capazes de acarretar alterações no ciclo de vida e nas peças bucais de determinados insetos aquáticos (Corbi et al., 2016). Há estudos mostrando que organismos coletores como as espécies de *Chironomus* acumulam maior concentração de metais do que organismos predadores (Corbi, 2016).

Diante dos problemas que a cana-de-açúcar pode causar na biota aquática é de extrema importância seu monitoramento, pela constante entrada de produtos químicos como os fertilizantes (Baptista et al., 2003). Essa preocupação se dá, pois, as comunidades de macroinvertebrados aquáticos, atuam em processos ecológicos de ciclagem de nutrientes e de transferência de energia no meio em que vivem, sendo fundamentais para o funcionamento de ecossistemas de água doce (VALDOVINOS; FIGUEROA, 2000).

A partir desse viés a importância de estudos detalhados a respeito desses impactos que estamos expostos decorrentes da monocultura açucareira, o presente trabalho avaliou os impactos que esse cultivo pode causar na espécie *Chironomus sancticaroli* e em suas gerações futuras com a finalidade de observar possíveis alterações em todo o ciclo de vida do organismo, como mudanças nos padrões de crescimento, fecundidade potencial,

proporções de emergência de adultos decorrentes da exposição ao sedimento de córregos localizados em áreas de cultivo de cana-de-açúcar.

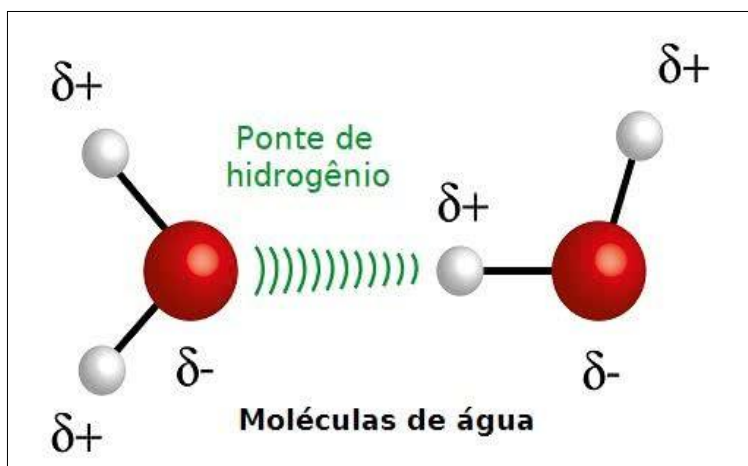
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Água e os ambientes aquáticos continentais

A água é o composto inorgânico mais abundante na matéria viva e é vital para sua manutenção e sobrevivência, sendo que os seres vivos possuem um percentil de água de 60% até 98% de seu peso. Nosso planeta possui 97% água salina, 2,2 % da água são geleiras, 0,8% de água doce, sendo que dessa água doce apenas 3% são águas superficiais disponíveis facilmente (VON SPERLING, 2014). A pequena parcela de água doce disponível é muito importante na atividade doméstica e industrial, também por ser sistema barato de descartes de efluentes, atendendo as necessidades humana. Porém, de forma incoerente, os rios e riachos vem sendo canalizados, represados, corrigidos, desviados e dragados desde os primórdios da civilização (ODUM, 1998; TOWNSEND; BEGON, 2010).

A água possui uma estrutura dipolar (um átomo de oxigênio com carga ligeiramente negativa, ligado a dois átomos de hidrogênio com carga ligeiramente positiva) (Figura 1). Essa diferença entre a eletronegatividade do H e a do O torna a água um bom solvente para solutos polares (hidrofílicos), pois é capaz de formar ligações de hidrogênio (pontes de hidrogênio) entre suas moléculas e com solutos, sendo assim atraí e dissolve muitas substâncias. Possui também uma capacidade térmica alta, sendo capaz de reter o calor de grandes corpos de água de maneira eficiente conservando sua temperatura em diferentes estações sem grandes variações. Consequentemente quanto mais alta a temperatura da água a solubilidade do oxigênio diminui, sendo o oxigênio um recurso indispensável para a sobrevivência da vegetação e dos animais do ambiente aquático (TOWNSEND, BEGON; HARPER, 2010; NELSON, 2014).

Figura 1- Molécula da água



Fonte: <http://biologiaresumoss.blogspot.com/> (2021).

Para a continuidade da sociedade moderna, cidadãos necessitam de uma grande disponibilidade de água, para suas atividades pessoais, profissionais e coletividade (ESTEVEZ, 2011). Com o crescimento populacional no mundo, junto com a interferência humana no ambiente aquático, em muitas pesquisas a degradação de recursos hídricos, vem mostrando que devido ao crescimento desordenado de cidades e atividades agrícolas, a aplicação de substâncias nocivas, são acumulados a ecossistemas aquáticos, acarretando problemas de bioacumulação em diferentes níveis tróficos (SIQUEIRA; BRAGA, 2000). Muitos locais no mundo estão sofrendo com riscos de escassez hídrica, e com a falta da qualidade da água, devido à grande necessidade da população crescente, causando grande preocupação na parte de segurança alimentar e econômica (CALIJURI; CUNHA, 2013). A biota Aquática vem sendo contaminada por diversas substâncias tóxicas, de diversas fontes de emissão, como efluentes industriais, derrames de lixos químicos acidentais ou propositais, esgoto doméstico, substâncias provenientes de processos agrícolas, contaminando de maneira ampla nossos recursos hídricos, com uma grande quantidade de agentes tóxicos (ARIAS et al., 2007).

A importância à existência de vida no planeta, está diretamente relacionada à conservação da água, tornando-se uma grande preocupação sua conservação e mecanismos que reduzam impactos ambientais nesses sistemas, sendo considerados pesquisas prioritárias (NEGREIROS, 1997). Contudo existem inúmeros contaminantes dos ambientes aquáticos, cada vez mais significativos, os poluentes emergentes como os

hormônios e agrotóxicos persistem no meio ambiente, e possuem relações com algumas doenças que acometem os seres humanos, tais como, como câncer, desregulação endócrina e acidente vascular cerebral (SODRÉ et al., 2007). Estudos também mostram contaminações por substâncias de origem exclusivamente antrópica como a cafeína oriundos de esgoto doméstico (BEGA et al, 2021).

Na agricultura, são utilizados pesticidas no combate de pragas e doenças no plantio, causando não só a contaminação de recursos hídricos, mas também alterações nos ecossistemas, e relevantes prejuízos à saúde, principalmente quando esses recursos hídricos são utilizados para consumo humano. Tal contaminação ocorre de maneira intensa em áreas próximas aos locais que se utilizam dessas substâncias, afetando não apenas os córregos, rios, como também a contaminação do lençol freático. A utilização de práticas agrícolas pertinentes pelos agricultores e medidas como a proteção das matas ciliares, previnem a contaminação por pesticidas dos recursos hídricos, contribuindo para o controle da poluição agrícola das condições locais (DELLAMATRICE et al., 2014).

A alimentação humana e animal é garantida pela agropecuária e existe uma expectativa mundial relacionada à necessidade crescente na produção de alimentos. Porém junto com essa crescente produção, vem a necessidade de uma demanda maior de uso da água, no aumento da eficiência agrícola, sendo que tal uso é responsável por pelo menos 70% do consumo mundial da água captada. Por outro lado, a irrigação pode ser comprometida pela deterioração na qualidade das águas, pela erosão e conseqüentemente assoreamento de cursos d'água, sem o devido respeito com a preservação da mata ciliar ou vegetação ripária, escoando para esses recursos hídricos substâncias indesejadas, causando o desarranjo no ecossistema daquele córrego, lago, rio. (BRITO et al., 2010).

Os pontos de estudo deste trabalho foram analisados também por CORBI (2006) onde foram selecionados córregos situados em áreas com cultivo de cana-de-açúcar, córregos localizados em áreas de pastagens e córregos localizados em áreas florestadas. onde observou desde 2006 que os Córregos Água Sumida, São João, Chibarro e Água Preta, possuíam ausência total de mata ciliar, sendo que o Córrego São Vicente com mata ciliar parcialmente impactada, e o Córrego Espreado com mata ciliar preservada, observou que em córregos com atividade canavieira juntamente com a remoção das matas ciliares o sedimento desses recursos hídricos estavam com uma concentração de pesticidas, herbicidas e fertilizantes contendo metais em concentração maior comparado

com córregos com vegetação ripária preservada. CORBI (2006) evidenciou também que todas as métricas utilizadas em seu estudo indicaram nitidamente stress ambiental em córregos sem mata ciliares localizados em áreas com plantio agrícolas, causando efeitos maléficos a riqueza faunística desses ecossistemas como os (EPT- *Ephemeroptera*, *Plecoptera* e *Trichoptera*) componentes sensíveis, indicando também a maior proporção de larvas de larvas de *Chironomus*. Além disso os índices bióticos utilizados, mostraram que a água boa a excelente era em córregos situados em áreas com mata ciliar preservada, e ruim a péssima para córregos situados em áreas agrícolas.

Com todos os acontecimentos existe a necessidade em preservar e proteger os recursos hídricos do planeta e, acima de tudo, tais recursos deveriam ser uma das prioridades do século XXI (KOLPIN; MEYER,2002: VON SPERLING, 2014). Muitos locais no mundo estão sofrendo com riscos de escassez hídrica e com a falta de qualidade da água, devido à grande necessidade da população crescente, ocasionando grande preocupação na parte de segurança alimentar e econômica (CALIJURI; CUNHA, 2013).

2.2. Ecossistemas aquáticos

O ecossistema ou sistema ecológico é a integração do ambiente físico (abiótico) com a comunidade (biótico), em sua funcionalidade e processos metabólicos. Normalmente os ecossistemas estáveis apresentam alta diversidade de espécies e o grau de estabilidade atingido por um ecossistema depende do ambiente externo e da eficiência dos controles internos (homeostase) (CALIJURI; CUNHA, 2013).

Em locais que a vegetação ripária (mata ciliar) é alterada, dando lugar a agricultura, ocorrem mudanças nesse riacho de longo alcance, mudando não só as condições físicas (escoamento de nutrientes, menos sombreamento), mas também mudanças correspondentes a cadeia trófica, contaminação dos recursos hídricos por agroquímicos (metais, fertilizantes, pesticidas e herbicidas), que são carregados para os córregos, através do processo de lixiviação do solo (SANTOS, 1999; TOWNSEND, BEGON & HARPER, 2010). Córregos com a vegetação ripária preservada, constituem-se de uma maior riqueza faunística, e de organismos mais sensíveis (*EPT-Ephemeroptera*, *Plecoptera* e *Trichoptera*) (CORBI, 2006). Em ambientes ricos com matéria orgânica morta, o oxigênio é rapidamente consumido na decomposição da

matéria orgânica, criando condições anaeróbias, que são letais para animais aeróbios, como os peixes e os macroinvertebrados (TOWNSEND, BEGON & HARPER, 2010).

O fundo do ecossistema aquático (região bentônica) compreende os substratos não consolidados ou consolidados. Podendo estar localizada na região eufótica (recebe luz solar, fotossíntese) ou afótica (ausência de luz) dependendo da profundidade do ambiente, é extremamente heterogênea, devido a sedimentos, rochas, conchas, detritos originados da região litorânea ou da vegetação terrestre e pela colonização de organismos bentônicos. Existem uma gama de táxons dominantes na região bentônica, dentre elas uma grande diversidade de insetos aquáticos e outros invertebrados, algas, macrófitas, além de peixes (ESTEVES, 2011). Os macroinvertebrados bentônicos que habitam os sedimentos do fundo em águas interiores são indicadores biológicos porque estão sujeitos à ação resultante dos poluentes respondendo a muitos estressores biológicos (CUMMINS et al., 1985; PALLOTTINI et al., 2017).

Indicadores físico-químicos e biológicos são utilizados para avaliar a saúde ecológica dos ecossistemas. A composição funcional das comunidades tem o potencial de prever o impacto da mudança ambiental nos ecossistemas. Os ecossistemas aquáticos são receptores temporários ou finais de muitos contaminantes, os quais podem ser lançados no ar, no solo ou diretamente nos recursos hídricos (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO 2013). Além dos indicadores físico químicos, a biota aquática também mostra a qualidade da água através dos macroinvertebrados aquáticos, assim como outras comunidades de organismos aquáticos, são essenciais na atividade dos ecossistemas de água doce, pois participam de processos ecológicos de ciclagem de nutrientes, e de transferência de energia no habitat em que vivem, retratando a diversidade ecológica do ambiente, respondendo a impactos de atividades antrópicas, por isso são utilizados como bioindicadores na avaliação da qualidade da água e no monitoramento ambiental (CARDOSO et al., 2017; CETESB, 2012). A utilização de macroinvertebrados como bioindicadores é indicada por alguns fatores: tamanho do corpo relativamente grande, alta diversidade de espécies, ciclo de vida longo (que torna a visualização de modificações ambientais em tempo eficiente) e de fácil amostragem (CALLISTO et al., 2001).

A crescente taxa de produção agrícola de cana de açúcar vem se mostrando como preocupação por impactar indiretamente os recursos hídricos (CORBI, 2006). Dessa forma os macroinvertebrados vem sendo utilizados em testes ecotoxicológicos agudos,

crônicos e de geração por diversos autores, para avaliação da qualidade ambiental (PAUMEN et al., 2008; VIVEIROS, 2012; CORBI, 2016; BERNEGOSI, 2019). Estudos apontam a influência da atividade canavieira sobre a comunidade de macroinvertebrados aquáticos, sendo que córregos localizados em áreas canavieira e de pastagem apresentam uma baixa variedade faunística, com domínio de 78% total de larvas de Chironomidae, enquanto que córregos localizados com vegetação ripária apresentam uma rica fauna aquática (CORBI et al., 2008). Dados indicam que diferentes concentrações de metais como Cd, Pb, Cr e Ni, são encontradas em fertilizantes vastamente empregados no cultivo de cana-de-açúcar, contaminando sedimento, córregos e larvas de insetos desses córregos situados nessas áreas impactadas (CORBI et al.; 2019). Sabe-se que o chumbo é encontrado naturalmente na natureza, porém interferências antrópicas, fazem com que esse aumento ocorra de maneira exponencial e descontrolada, tornando-o um grande problema (ARAUJO et al., 2020).

Figura 2- Exemplo de ecossistema aquático, Córrego Anhumas, situado no município de Américo Brasiliense



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

2.3. A cana-de-açúcar e o uso de agrotóxicos

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com cerca de 665,1 milhões de toneladas processadas na safra (2020/2021) (figura 3). O maior produtor nacional de cana-de-açúcar no Brasil é o Estado de São Paulo, com 180 milhões de toneladas na área de $2,5 \times 10^6$ hectares, possuindo condições climáticas

favoráveis para a produção de cana-de-açúcar, apresentando 82% da produção da região Sudeste. Com um percentil de 20% na produção global, onde é responsável por 45% da exportação mundial de açúcar. Com o cultivo da cana-de-açúcar o uso de herbicidas e fertilizantes durante os distintos estágios do plantio, a quantidade de metais como cobre, chumbo, cromo, níquel, manganês, magnésio, zinco e cádmio são lixiviados para os corpos d'água (CORBI et al., 2016). Sendo que os impactos ambientais ocasionados pelo cultivo da cana-de-açúcar, com o uso intensivo de pesticidas, fertilizantes, o revolvimento do solo e a retirada das matas ciliares, têm sido objeto de discussão em diversos fóruns (AGEITEC, 2019).

Com a soma de todos esses fatores, a intensa destruição da mata ciliar, que age como protetor de córregos, filtrando toxinas indesejadas ao ecossistema aquático, vem sofrendo intensa destruição, causando grande perda da biodiversidade desse ambiente aquático (CORBI et al., 2016). A retirada da mata ciliar ocasionada por práticas agrícolas, retira a proteção dos recursos hídricos, possibilitando o aumento dos níveis de partículas de solo suspensas e na contaminação química, causando assim mudanças no habitat e perda da biodiversidade aquática (SURIANO; FONSECA-GESSNER, 2013). A utilização de pesticidas e fertilizantes podem atingir tanto os organismos alvos das plantações, como os não alvos, como é o caso dos macroinvertebrados aquáticos (CORBI et al., 2006; SPADOTTO, 2006; MELLO et al., 2019). Consequentemente a condição da biota local, é um indicador expressivo da integridade de um ambiente aquático ao entorno de uma plantação (CORBI et al., 2016).

O Brasil se destaca por utilizar grandes quantidades de pesticidas e, no ano 2017, comercializou aproximadamente 540 mil toneladas de pesticidas (em um contexto mais amplo), sendo um composto organofosforado, especificamente fosfonato, o herbicida, mais vendido, somando aproximadamente 173 mil toneladas (IBAMA, 2019). Sabe-se que os herbicidas são as substâncias mais preocupantes do ponto de vista ambiental, pois suas características de mobilidade no solo, leva-os a serem encontrados em águas subterrâneas com frequência (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

A utilização de agrotóxicos na agricultura é recomendada para controle de pragas e no aumento de produção de alimentos. Porém é necessário utilizá-lo com cautela, a fim de evitar prejuízos à saúde humana, e ao meio ambiente, preservando assim a qualidade do solo e da água e a vida no meio terrestre e aquático. Córregos situados nas áreas de

cana-de-açúcar, apresentam valores de cobre e zinco em maior proporção (PEALÀEZ-RODRIGUES, 2001; CORBI, 2006), que também podem estar associados a queimada (ZIOILLI, 1995). Diversos estudos comprovam os impactos tóxicos causados à saúde e ao meio ambiente por essas substâncias, como a toxicidade à biota ambiental ocasionando má formações como exemplo, perda da diversidade nos ecossistemas, desregulação endócrina e carcinogenicidade para os seres humanos (KIM et al., 2016; KING, 2019; TADEI et al.; 2019; SOLIS et al., 2017; FRIEDICH C. et al., 2021).

Sendo o mais vendido de todos os agrotóxicos o herbicida fosfonato, que é capaz de controlar uma variedade de ervas daninhas, acarretando a ocorrência de resíduos para o meio ambiente de forma geral, e nos alimentos que serão consumidos (SOUZA et al., 2020). A legislação brasileira não faz revisões periódicas no registro de agrotóxicos, sendo que muitos deles utilizados no Brasil (399 ativos), são proibidos em outros países por seu alto grau de toxicidade, foram relacionados 120 ativos de agrotóxicos, que causam danos à saúde humana e ao meio ambiente, que são responsáveis por efeitos irreversíveis (FRIEDICH et al., 2021). Estudou-se também que doenças como Parkinson, Alzheimer, câncer, alterações hormonais e esterilidade podem ocorrer em pessoas com exposição crônica a agrotóxicos, já que os mesmos são altamente tóxicos (VASCONCELLOS et al., 2020).

A exposição crônica a agrotóxicos deve ser investigada, devido a associações a algumas doenças associadas a danos neurológicos, como Alzheimer, Parkinson, além de desarranjos no metabolismo das células, causando câncer, e problemas de origem endócrina, provocando alterações hormonais e esterilidade (BARTH et al., 2010). Tais efeitos crônicos dos agrotóxicos podem se expressar em tempos variados, podendo se manifestar por meses ou anos após sua exposição. A Doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa, com maior incidência, ficando atrás somente da doença de Alzheimer, entre as patologias do sistema nervoso central (BELLOU et al., 2015) A exposição aos agrotóxicos ocorre no trabalho, em fábricas e empresas que transportam e comercializam, como também em produções agrícola, ou por moradores que moram próximos desses ambientes a áreas rurais ou urbanas, sendo atingidos pela contaminação do ar, do solo e da água (RIGOTTO et al., 2015).

A atividade agrícola moderna, expõe trabalhadores a uma variedade de problemas respiratórios, devido a exposições a vários agentes como a poeira inorgânica a partir do

solo, poeira orgânica contendo microrganismos, micotoxinas ou alérgenos, gases de decomposição, pesticidas entre outros, causando malefícios à saúde afetando vias aéreas e síndromes tóxicas, desencadeando asma brônquica e pneumonia, rinite, sinusite e otite, onde muitos trabalhadores rurais não possuem diagnóstico e tampouco tratamento, vivendo e trabalhando no mesmo ambiente (VIEGAS et al., 2000). Estudou-se também que doenças como Parkinson, Alzheimer, câncer, alterações hormonais e esterilidade podem ocorrer em pessoas com exposição crônica a agrotóxicos, já que os mesmos são altamente tóxicos (VASCONCELLOS et al., 2020). Por outro lado, na biota aquática, Corbi et al (2016) verificou que houve perda de diversidade e alteração na estrutura da comunidade de macroinvertebrados. Efeitos de bioacumulação de metais decorrentes de áreas adjacentes à cana-de-açúcar também foram relatados por Corbi et al. (2006). Em insetos aquáticos, estudos com *Chironomus sancticaroli* foi verificada alteração da emergência e deformidade nas asas em exposição à agrotóxicos (Corbi et al. 2016).

Estudos mostraram também que muitos herbicidas comuns, utilizados em países de terceiro mundo foram testados vários produtos sem critérios observando quais matariam as ervas daninhas, sendo que muitos deles são proibidos em países europeus e na América do Norte, devido a avaliação de seus efeitos a médio e longo prazo. O herbicida Atrazina por exemplo, foi estudado na Universidade da Califórnia em Berkeley, observou que pode causar alterações nas características reprodutivas em sapos expostos a essa substância, causando preocupações sobre o efeito da Atrazina pode ter em fetos, bebês e crianças pré- púberes, sendo proibido na França, Alemanha, Itália, Suécia e Noruega. O herbicida Glifosato, utilizado em plantas geneticamente modificadas, podem causar convulsões em seres humanos e também problemas congênitos em crianças nascidas de genitores expostos a essas substâncias, também como efeito colateral matar muitos insetos benéficos, causando um desequilíbrio populacional de insetos, e consequentemente tendo que recorrer a utilização de mais pesticidas para combater os insetos prejudiciais. O Fosfonato Glifosato, o ingrediente ativo da marca Roundup é usado no controle de plantas daninhas porém sua utilização pode causar doenças relacionadas a irritações nos olhos e na pele, dores de cabeça, náuseas e palpitações cardíacas, causando efeitos prejudiciais na saúde do solo, e nas plantas envolvidas.(365saude.com.br).

Figura 3 - Plantação de cana-de-açúcar



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Estudos mostram que em plantações agrícolas de cana-de-açúcar, os agrotóxicos utilizados são carregados para córregos ou rios, através do processo de lixiviação do solo, contaminando esses recursos hídricos, o sedimento desses ambientes e a água, acarretando problemas de bioacumulação que é a incapacidade do organismo eliminar, para diferentes níveis tróficos (OLIVEIRA & TORNISIELO, 2000; SANTOS, 1999). Os agrotóxicos mais utilizados no plantio de cana-de-açúcar são os diuron, tebutiuron, hexazinona, ametrina e imidacloprido, que contém cargas elevadas de metais pesados como o cádmio, cobre, zinco, manganês, ferro, magnésio, alumínio e matéria orgânica (CORBI, 2006; ACAYABA, 2017). As concentrações de metais totais são mais elevadas nos sedimentos dos córregos em localizações com o cultivo da cana-de-açúcar (CORBI, 2006). O uso de parâmetros biológicos para medir a qualidade da água estabelece respostas dos organismos em relação ao meio em que vivem (MUGNAI, NESSIMIAN & BAPTISTA, 2010). Nesse sentido, pode-se optar por diversas ferramentas, como caracterização da biota aquática para avaliação das espécies presentes ou aplicação de testes ecotoxicológicos (CETESB 2012).

2.4. A Ecotoxicologia como ferramenta para análises ambientais

O termo ecotoxicologia foi proposto por René Truhaut em 1969, como um ramo da toxicologia voltado para o estudo dos efeitos adversos das substâncias sobre os ecossistemas. A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais

ou sintéticas sobre a biota e a flora, terrestre e aquática do nosso planeta e a interação dessas substâncias, estudando os efeitos dos poluentes nos organismos e a interação deles em seus habitats (PLAA, 1982; Cairns; Niederrlehner, 1995; Blaise, 1984). Com a ecotoxicologia avaliamos os danos ocorridos nos diversos ecossistemas contaminados, funciona como um auxílio para prever impactos futuros numa possível poluição de um dado ambiente (RAND, 1995).

Os testes de ecotoxicidade são ensaios com condições laboratoriais específicas e controladas, porém servem como um parâmetro na avaliação da qualidade da água e do sedimento, contribuindo para uma eficaz tomada de decisão, também utilizado na avaliação de efeitos de contaminantes na biota aquática, e na seleção de substâncias usadas na indústria farmacêutica e de aditivos agrícolas. A ecotoxicologia abrange conceitos ecológicos como a representatividade dos organismos, a diversidade e o significado ecológico nos ecossistemas, e já a toxicologia engloba efeitos prejudiciais de uma substância sobre uma comunidade biológica (COSTA et al., 2008; SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Em 1975 foram desenvolvidos alguns métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, de curta duração utilizando vários grupos de espécies de organismos, e testes com sedimentos para a avaliação de recursos hídricos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2014). Os ensaios de ecotoxicidade podem ser teste de toxicidade aguda ou teste de toxicidade crônica, onde o teste de toxicidade aguda considera a frequência das respostas dos organismos de uma população exposto a uma concentração definida de uma substância com o objetivo de determinar a concentração letal média (CL50), no qual metade dos indivíduos morrem após a exposição ao agente tóxico. O teste de toxicidade crônica tem o propósito de definir as concentrações que causam impacto de importância sobre a resposta como reprodução, crescimento e desenvolvimento dos organismos, sendo dependente dos testes de toxicidade aguda, pois as concentrações subletais são calculadas a partir do CL50. As respostas são analisadas por meio de testes de hipóteses, com a finalidade de observar as respostas significativamente diferentes da observada no controle (situação na ausência do contaminante) (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2014).

Além desses dois tipos de testes, tem-se o chamado teste de gerações ou teste multigeracional, que se tem destacado nas pesquisas de ecotoxicidade. Esses testes permitem avaliar os efeitos crônicos da toxicidade ao longo de várias gerações, no qual

possibilita a resposta de análises adicionais, quando comparado a teste de ecotoxicidade aguda e crônica tradicionais, pois ele analisa não só o ciclo de vida vigente do organismo, mas também os futuros ciclos de vida do organismo (BERNEGOSI et al., 2019).

Os efeitos tóxicos observados em vários estudos, apresentam alterações no desenvolvimento, viabilidade, ciclo de vida, atraso na emergência do adulto (SARAIVA, 2016), no gênero sexual de emergência de adultos (RAKOTONDRAVELO et al., 2006) e deformações bucal e antenal do *Chironomus sancticaroli* (MADDEN et al., 1992).

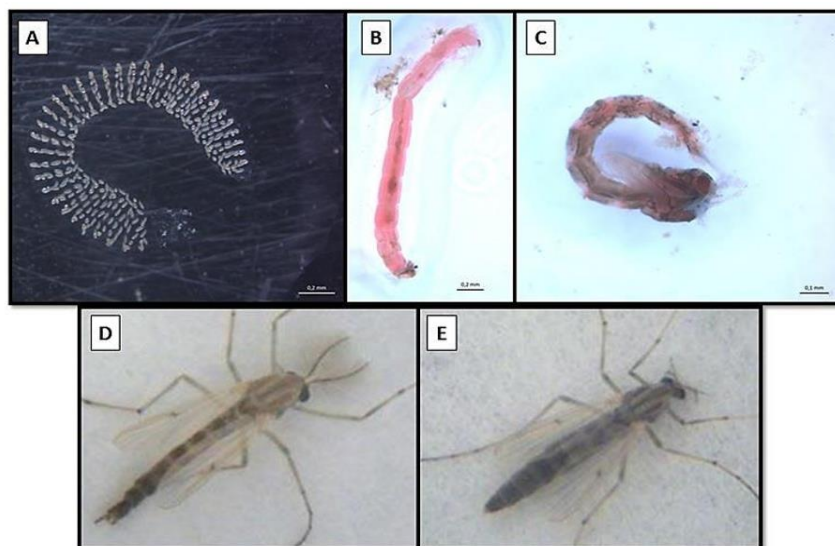
Para a utilização de organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos, as espécies indicadas devem possuir características como sensibilidade constante à uma diversidade de agentes químicos, apresentando repetitividade e reprodutividade dos resultados, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório, ciclos de vida curtos, disponibilidade nos ambientes, estabilidade genética e representatividade de seu nível trófico (DOMINGUES, 2008). Os macroinvertebrados bentônicos são espécies indicadas como organismo-teste para ensaios ecotoxicológicos, por serem bons bioindicadores de qualidade das águas em ambientes lóticos, por possuírem ciclo de vida relativamente longo, de fácil visualização e características estáveis (ROSENBERG, 1992; DORNFELD, 2006; ROQUE et al., 2010; TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

2.5. *Chironomus sancticaroli* como organismo-teste

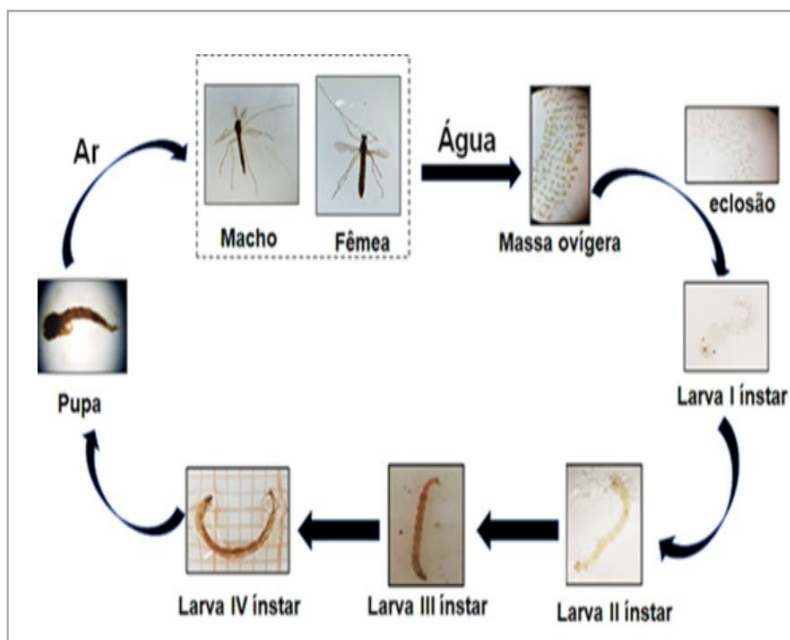
Os macroinvertebrados são organismos que ficam retidos em uma malha de 0,2-0,5 mm, sendo representados pelas espécies de Annelida, Mollusca, Crustacea e principalmente Insecta (ROSENBERG; RESH, 1993) e são associados ao fundo de substratos de recursos hídricos (ROSENBERG, 1992; DORNFELD, 2006). O uso de macroinvertebrados aquáticos como bioindicadores de poluição é devido à sua habilidade em indicar de maneira previsível poluentes específicos, como metais potencialmente tóxicos, fertilizantes químicos e pesticidas (WINNER et al., 1980; DANCE; HYNES, 1980). Sua utilização como bioindicadores se dá ao fato de possuir ciclo de vida suficiente para sua observação, tamanho de corpo relativamente grande, alta diversidade de espécie, fácil amostragem, fornecendo respostas variadas a diferentes níveis de contaminação ou impacto (CALLISTO et al., 2001; CORBI, 2021). Estudiosos também observaram que em áreas com a mata ciliar prejudicada, existe uma seleção desses macroinvertebrados, reduzindo-os em proporção e variedade (CORBI, 2006).

A espécie *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino, é um macroinvertebrado aquático, pertencente à família Chironomidae, inseto da ordem Díptera, coletados no município de São Carlos (São Paulo, Brasil). Possui ciclo de vida holometábolo (sofrendo metamorfose completa), ciclo de vida (figura 4 e 5) consideravelmente curto, sendo os quatros estágios do organismo (ovo; instares larvais - I instar, II instar, III instar e IV instar; pupa e adulto) desenvolvidos por aproximadamente 13 dias. O período larval é predominante no ciclo de vida, seguido pelo período de pupa e adulto (FONSECA, 1997; MUGNAI; NESSIMIAN; BAPTISTA, 2010) vivendo em diferentes ambientes aquáticos, devido a seu mecanismo de respiração, no qual possui hemoglobina, o que garante a sobrevivência ao ocupar ambientes com baixa concentração de oxigênio dissolvido (Trivinho-Strixino, 2011). Tal espécie inicia sua vida no ambiente aquático e emerge em ambiente terrestre como mosquito. Na emergência dos adultos observamos uma variação em suas características de acordo com o sexo do organismo, os machos possuem coloração amarelo esverdeada com abdômen afinado e antena plumosa, e as fêmeas possuem coloração acastanhada, com abdômen mais encorpado e antena pilosa (TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

Figura 4 - Estágios de vida de *Chironomus sancticaroli*. A: Massa Ovígera; B: Larva; C: Pupa; D: Adulto Macho e E: Adulto Fêmea.



Fonte: VICENTINI (2014)

Figura 5 - Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*

Fonte: LEAA (2021)

Na fase adulta os mosquitos não se alimentam, apenas possuem a função de reprodução, com isso seu aparelho bucal é diminuído. Após a cópula, os ovos (mais ou menos 550 por fêmea) são depositados na água e ficam alocados em uma massa mucilaginosa em formato cilíndrico ou espiral, e demoram 44 a 48 horas para a eclosão das larvas do 1 instar em ambientes aquáticos (FONSECA; ROCHA, 2004), possuem comportamento planctônico nos primeiros instares, e nas fases seguintes comportamento bentônicos onde constroem casulos a partir do substrato e secreção salivar, ficam localizadas nas camadas superficiais do sedimento, se alimentam por meio de pequenas partículas na entrada do casulo, quando a larva se movimenta dentro do casulo acontece um fluxo de água pra dentro, onde ocorre o processo de alimentação, ou quando as larvas impulsionam o corpo para dentro do casulo (OLIVER, 1971). A espécie se alimenta de matérias orgânicas suspensas na água, como algas, bactérias e da massa ovígera, no início do desenvolvimento larval (OLIVER, 1971; TRIVINHO-STRIXINO, 1980). Com o passar dos dias as larvas vão adquirindo coloração avermelhada, devido a presença de hemoglobina na hemolinfa, e passando por estágios do primeiro ao quarto instar, se tornando pupas, e conseqüentemente emergindo os adultos (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

3. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo analisar a influência do cultivo da cana-de-açúcar próximo aos córregos de água e os efeitos dessa associação para o ciclo de vida da espécie *Chironomus sancticaroli*, em ensaios de laboratório.

3.1. Objetivos específicos

- Analisar as variáveis físicas e químicas da água dos córregos: oxigênio dissolvido, pH, condutividade e temperatura dos 7 córregos estudados;
- Realizar ensaios de geração utilizando o sedimento dos 7 córregos;
- Analisar alterações no comprimento do corpo das larvas;
- Analisar alterações no comprimento das asas e fecundidade de fêmeas da espécie.
- Analisar alterações na taxa de emergência de adultos;
- Analisar a mortalidade das larvas da espécie expostas ao sedimento dos córregos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho dividiu-se em duas fases: atividade de campo (Figura 6-a) e de laboratório (Figura 6-b). A primeira etapa contém uma variedade de atividades como a realização e observações dos ambientes (protocolo de caracterização ambiental) ao redor do corpo d'água, (vegetação, luminosidade, preservação, cultivo de monocultura), análises das variáveis físicas e químicas da água e coleta de amostras do sedimento para bioensaio de toxicidade laboratoriais. A segunda fase consistiu em expor o organismo-teste a bioensaios laboratoriais utilizando a espécie de inseto aquático *Chironomus sancticaroli*, com o sedimento coletado do campo, em condições controladas de temperatura e luminosidade.

Figura 6- a) Primeira fase do trabalho: atividade de campo; b) Segunda fase do trabalho: atividade de laboratório, teste de geração



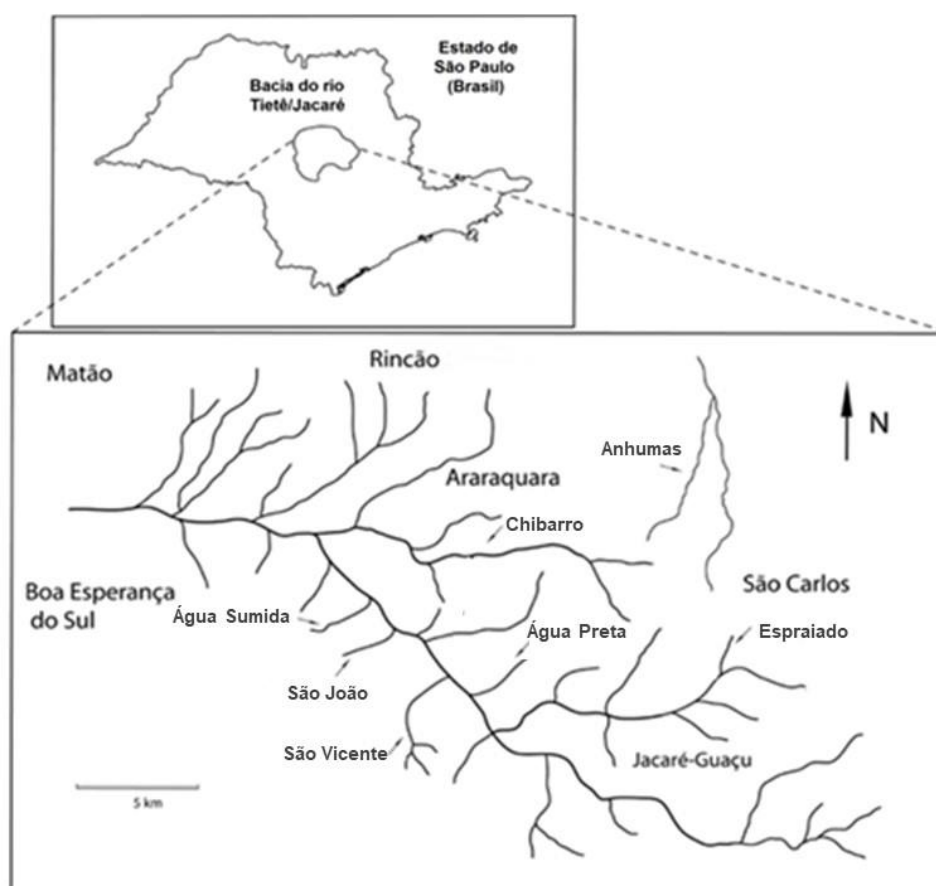
Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.1. Área de estudo

A pesquisa foi realizada em sete córregos, situados em quatro cidades distintas (Araraquara, Guarapiranga, Américo Brasiliense e São Carlos) com diferentes características quanto ao seu uso e ocupação do solo, sendo quatro córregos próximos a cultivo de cana-de-açúcar e três córregos em locais com mata ciliar preservada (Figura 7).

As coletas do sedimento para a realização dos testes de toxicidade foram realizadas durante três períodos, outubro de 2020, janeiro de 2021 e maio de 2021.

Figura 7- Mapa mostrando a Bacia do rio Tietê-Jacaré com a localização dos córregos estudados



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.1.1. Córrego Água Sumida

Localizado entre o município de Araraquara e o Distrito de Guarapiranga nas coordenadas $21^{\circ}56'S48^{\circ}16'W$. Este córrego, de 1ª ordem, nasce próximo a Guarapiranga, percorre uma extensão de aproximadamente 5 km em fazendas com grandes plantações de cana-de-açúcar, impactado, ausência total de mata ciliar, a alta concentração de metais costuma ser uma característica do local segundo estudos prévios (CORBI; 2006), deságua no Rio Jacaré-Guaçu (Figura 8- a) e b)).

Figura 8- a) e b); Vista geral do Córrego Água Sumida



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.1.2. Córrego São João

Localizado no Distrito de Guarapiranga nas coordenadas $21^{\circ}57'S 48^{\circ}15'W$. Córrego de 1ª ordem, que percorre uma extensão de aproximadamente 10 km, com uma área de intensa atividade canieira, e deságua no Rio Jacaré- Guaçu. Trecho analisado apresenta ausência total de mata ciliar. Ambiente muito impactado, água com odor desagradável, presença de macrófitas, presença de lixo, ambiente exposto à luz solar (Figura 9).

Figura 9- a) Vista geral do Córrego São João; b) Coleta de amostras de sedimento no córrego São João



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.1.3. Córrego Chibarro

Localizado entre os municípios de Araraquara e Ibaté entre as coordenadas $21^{\circ}52'S$ $48^{\circ}0,5'W$. Córrego de 2ª ordem que nasce próximo ao município de Ibaté, percorrendo uma extensão de aproximadamente 25 km desaguando no rio Jacaré-Guaçu. O trecho analisado apresenta ausência total de mata ciliar, área de ambiente impactado com leito exposto a erosão (incidência de luz solar permanente, ambiente Autotrófico) presença de lixo, presença de macrófitas e perifíton (Figura 10- a) e b)).

Figura 10- a) Vista geral do Córrego Chibarro; b) Análise de parâmetros físicos e químicos da água



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.1.4. Córrego Espraiado

Localizado no município de São Carlos nas coordenadas 21°53'S 47°52'W. Este córrego de 1ª ordem nasce próximo aos limites do Parque Ecológico em São Carlos, em uma área com mata ciliar preservada, percorre uma extensão de aproximadamente de 4 Km de água e deságua no Ribeirão Monjolinho (Figura, 11- a) e b)).

Figura 11- a) e b) Vista geral do Córrego Espraiado



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.1.5. Córrego Anhumas

Localizado no município de Américo Brasiliense nas coordenadas 21°42's 48°00'w., se encontra dentro do clube Náutico de Araraquara, Cerrado. Este córrego é de 2ª ordem, com mata ciliar preservada, e uma outra parte presença do plantio de cana-de-açúcar e deságua no Rio Mogi Guaçu (Figura 12 - a) e b)).

Figura 12- a) e b) Vista geral do Córrego Anhumas



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.1.6. Córrego São Vicente

Localizado entre Distrito de Guarapiranga e o município Ribeirão Bonito nas coordenadas $21^{\circ}59'S$ $48^{\circ}15'W$. Este córrego de 1ª ordem, nasce em um morro próximo a Guarapiranga, com atividade canavieira possui presença de mata ciliar parcialmente impactada, pois possui pouca diversidade e a ausência de plantas nativas, pouca luminosidade ao redor do córrego, o córrego situa-se ao redor do plantio de cana-de-açúcar, o trecho percorre uma extensão de aproximadamente 10 km onde deságua no Rio Jacaré-Guaçu (Figura 13- a) e b)).

Figura 13- a) Córrego São Vicente, leitura dos parâmetros físicos e químicos da água, b) Vista geral do Córrego São Vicente.



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.1.7. Córrego Água Preta

Localizado entre o distrito de Guarapiranga e o município Ribeirão Bonito nas coordenadas 22°00`S 48° 12`W. É um córrego de 1ª ordem, com sua nascente próximo a Ribeirão Bonito, em uma área com intensa pastagem, com uma extensão de 10 km percorrido rumo ao Rio Jacaré-Guaçu. O trecho analisado encontra-se numa área com ausência total de mata ciliar, com leito exposto a erosão, incidência de luz solar permanente, ambiente autotrófico, presença de macrófitas e perifíton (Figura 14).

Figura 14- Vista geral do Córrego Água Preta, mostrando a presença de macrófitas aquáticas



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.2. Variáveis físicas e químicas da água

Foram medidas em campo as variáveis de oxigênio dissolvido, pH, turbidez, condutividade elétrica e temperatura dos córregos, em todos os períodos de coleta, com o auxílio de aparelho AK88, medidor multiparâmetros à prova d'água, da marca AKSO (Figura 15).

Figura 15- Sonda multiparâmetros da marca da marca AKSO



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.3. Coleta de sedimento

Para a realização dos testes de toxicidade, o sedimento foi coletado em cada córrego e período, com auxílio de uma espátula de plástico (devido baixa profundidade dos córregos) (Figura 16), ou com a draga Ekman (em locais com maior profundidade) (Figura 17) e acondicionado em potes de plásticos, transportados em caixas térmicas com gelo, até serem armazenados em geladeiras com temperaturas inferiores a 10°C (ABNT, 2015).

Figura 16 - Pá utilizada na coleta, pote plástico de 500 ml para armazenar sedimento e pisseta em polietileno para água 500 ml, com água deionizada para a limpeza das sondas do aparelho medidor de multiparâmetros



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Figura 17 - Draga de Ekman, coletando sedimento no Córrego Chibarro



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.4. Cultivo de *Chironomus sancticaroli*

As larvas de *Chironomus sancticaroli*, cujos cultivos foram mantidos em bandejas plásticas, com aeração constante, areia tratada em seu interior, água desclorificada e alimentação semanal com 22 mg de ração TetraMin®. As bandejas foram cobertas com uma gaiola de tule, para que os adultos permanecessem aprisionados (Figura 18). Foram acondicionados numa sala com temperatura controlada e mantida entre 25°C podendo

variar 2°C para mais ou menos e com fotoperíodo programado para 12h luz e 12h ausência de luz, seguindo os métodos de manutenção recomendados por Fonseca (1997) e Trivinho-Strixino e Strixino (1995). O organismo-teste foi criado no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), localizado na cidade de São Carlos, Estado de São Paulo.

Figura 18 - Gaiolas de cultivo de *Chironomus sancticaroli*



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

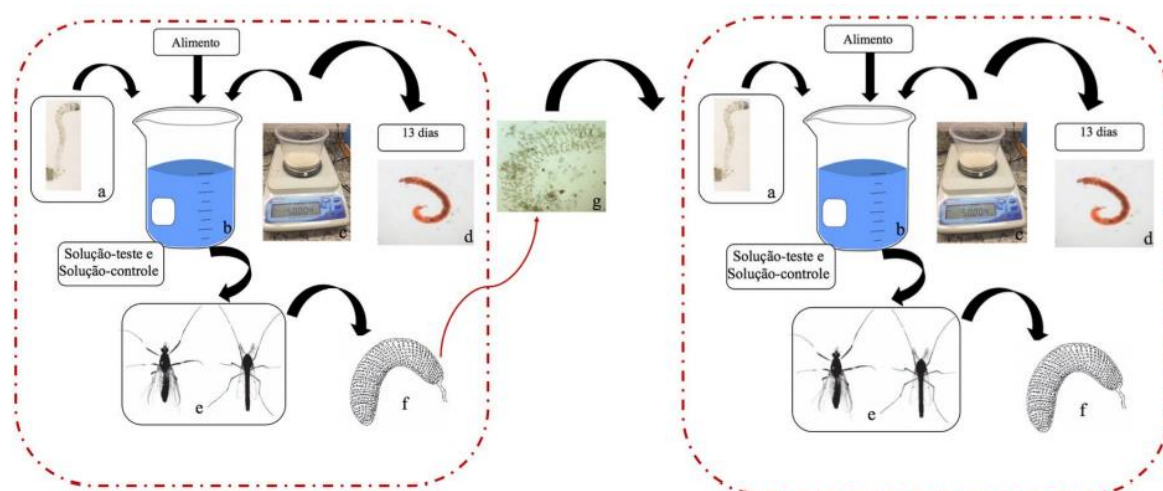
4.5. Teste de geração utilizando sedimento

O teste de geração, descrito por Bernegossi et al., 2019, aponta que é um teste de toxicidade crônica de longa duração, onde observa-se algum padrão no desenvolvimento dos organismos expostos a uma determinada “toxina” ou substância, durante três gerações consecutivas (geração P- parental, geração 1- G1 e geração 2- G2), em todo o ciclo de vida do organismo e suas gerações futuras. Alguns dos parâmetros observados são crescimento, fecundidade potencial, presença de deformidades no mento e taxa de emergência de adultos.

Neste trabalho foi realizado teste de geração utilizando sedimento de sete córregos: Água Sumida, Chibarro, Espreado, Anhumas, Água Preta, São Vicente e São João.

O teste de geração (figura 19) com o sedimento dos córregos foi desenvolvido conforme metodologia descrita por Bernegossi et al. (2019), com algumas adaptações, em que 15 larvas de I instar de *C. sancticaroli* (figura 19), foram montadas em quadruplicadas, para cada córrego, as larvas (figura 24) foram colocadas em potes plásticos estéreis de 500 ml, onde foi inserido 60 gramas de sedimento dos córregos (figura 20), 240 ml de água desclorificada (água comum de filtro, sem cloro), 5mL de alimento (solução de TetraMin® 5g L⁻¹) onde foi mantido em aeração, fotoperíodo e temperatura controlada em laboratório (Figura 30).

Figura 19 - Teste de geração: a) pote de 500 ml, b) larvas de I instar, c) sedimento, d) água deionizada, e) emergência de adultos, f) desova, g) montagem da geração seguinte e h) amostragem de larvas



Fonte: Bernegossi et al. (2019)

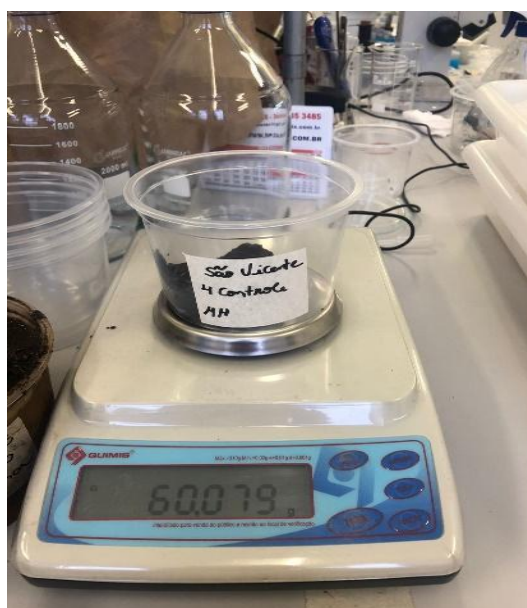
Para o fechamento dos potes plásticos foi feito um furo na tampa plástica com tesoura e colocado um tule por baixo da tampa (figura 21), para que os organismos alados não escapassem e conseguissem acasalar e desovar no pote plástico. Os adultos foram coletados com o auxílio de um canudo adaptado com tule e elástico na ponta. Posteriormente, foram armazenados em eppendorfs com álcool isopropílico como fixador na geladeira até o corte de suas asas e a montagem das lâminas a fim de examinar o comprimento das asas e sua fecundidade.

Foram coletadas também todas as desovas desses organismos (figuras 23- a) e b)), que se depositavam em constância nas bordas dos potes plásticos para novos ensaios de

futuras gerações (G1 e G2), repetindo assim até a 2ª geração. Após o aparecimento de cada desova, a mesma foi separada e mantida sob baixa aeração (bolhas de ar não contínuas) em um béquer de 50 ml, com água desclorificada, até sua eclosão para montagem da próxima geração.

O tratamento controle do teste de gerações (figura 22) foi preparado com água desclorificada (240ml), areia fina para aquário (60g) e 5 ml de alimento (solução de ração para peixe tipo TetraMin® 5g L⁻¹). Após o surgimento dos adultos, as fêmeas foram armazenadas em álcool isopropílico para posterior análise.

Figura 20 - Pesagem do sedimento



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Figura 21 - Pote adaptado para os ensaios



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Figura 22 - Teste de geração



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Figura 23- a) Desova de *Chironomus sancticaroli* coletada dos ensaios b) Desova coletada e pronta para aerar, aguardando sua eclosão para os ensaios



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Figura 24- Larvas de *Chironomus sancticaroli*



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

As características gerais do teste de gerações estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na realização do teste de gerações

Teste de Gerações	
Volume água	240 ml
Sedimento	60g
Exposição	Indeterminado
Organismos	15
Instar	I
Réplicas	4
Aeração	Constante
Temperatura	24±2°C
Fotoperíodo	12h luz/12h escuro
Alimentação	Uma vez por semana

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

4.6. Comprimento das asas e fecundidade potencial

Para a realização do comprimento alar, primeiramente foi feita a montagem de lâminas com as asas das fêmeas. As asas direita e esquerda das fêmeas adultas foram cuidadosamente destacadas como auxílio de seringas descartáveis para insulina da marca SOLIDOR (figura 25- b)), e substituídas assim que perdiam o corte, com o auxílio de uma lupa, equipamento “Estereomicroscópio da marca Nikon, foram coloridas com corante Fucsina ácida (Marca Synth, adquirido pela empresa Sigma-Aldrich®, C.I. 42685) (Figura 25- a)).

Figura 25 – a) Lupa eletrônica, coloração e remoção das asas, b) Seringas utilizadas na remoção das asas



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

As asas foram coloridas com corante ácido fucsina (Marca Synth, adquirido pela empresa Sigma-Aldrich®, C.I. 42685) (figura 26- a)). O procedimento consistiu em primeiro deixar as asas de molho na potassa (KOH 10%) durante 1h (temperatura ambiente). Depois as asas foram lavadas com ácido acético 20% e coradas com a fucsina ácida por 48 h. As asas foram retiradas do corante e lavadas novamente no ácido acético 20%. Após esse procedimento, as asas foram passadas em uma sequência de soluções de álcool 70%, álcool 80% e álcool 100% para posteriormente serem colocadas nas lâminas com Bálsamo do Canadá sintéticos (fabricado pelo laboratório LABSYNTH Produtos para laboratório Ltda, adquirido pela empresa LAC- Artigos para laboratório) e cobertas com por lamínulas limpas em álcool, com o objetivo de manter sua limpeza e nitidez (figura 26- b)). As lâminas foram secadas em estufa a 20°C por 7 dias.

Figura 26- a) *Chironomus sancticaroli* corado com corante ácido fucsina; b) Montagem das lâminas



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

O comprimento da asa foi feito com o auxílio de lente graduada acoplada a um microscópio óptico da marca Quimis com o aumento de 200x e considerando a distância entre a alula e o ápice da asa (Figura 27).

A fecundidade potencial da fêmea adulta foi feita seguindo a metodologia recomendada por Trivinho-Strixino (1980) para a espécie *Chironomus sancticaroli*. Sendo que o número de ovos da primeira desova presente no ovário das fêmeas foi estimado por meio da equação:

$$F = (K \times L) - m$$

onde:

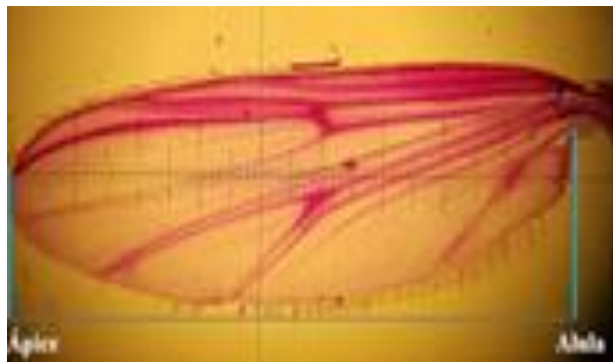
F = fecundidade potencial

K = uma constante (471,64)

L = comprimento da asa

m = constante (707,41).

Figura 27 - Medição do comprimento de asas da fêmea de *Chironomus sancticaroli* com a utilização de lente graduada.



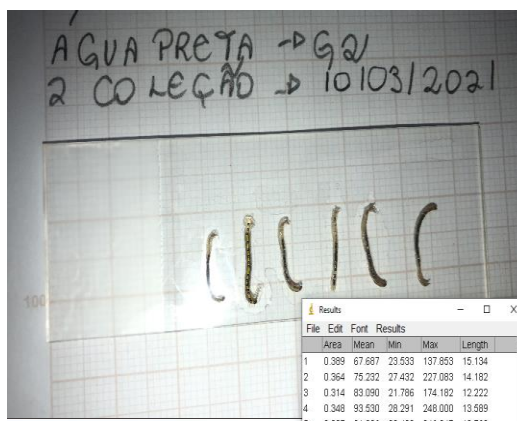
Fonte: LEAA (2021)

4.7. Comprimento das larvas

No 12º dia, todas as larvas vivas da 4ª réplica do teste de gerações foram amostradas após a exposição aos diferentes sedimentos. Para isso, as larvas foram dispostas sobre uma lâmina “banhados” em álcool isopropílico (Figura 28). Essa lâmina foi colocada acima de um papel milimetrado para que fosse possível estabelecer a escala de medição e posteriormente foram fotografadas.

As imagens fotografadas foram exportadas para o *software* IMAGEJ (Rasband, 2018) para que o comprimento fosse medido. No programa, sempre que uma nova fotografia foi aberta, a escala foi determinada (relação entre o pixel da imagem e 1 mm). Foram medidas sempre seis larvas de cada tratamento, caso houvesse mais de seis larvas amostradas, foram medidas a maior e a menor larva e as outras quatro aleatoriamente para minimizar interferências.

Figura 28 - Larvas de *Chironomus sancticaroli*, com 12º dias



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.8. Emergência de adultos

No “teste de geração”, seguindo a metodologia Bernegossi et al., 2019, houve o desenvolvimento do bioensaio de emergência ao longo de três gerações do mosquito. Onde larvas de *Chironomus sancticaroli* de I instar (Geração Parental), foram inseridas no teste até que todos os organismos se tornassem adultos, ou até que fossem encontrados a última larva morta. Foram feitas observações diárias, até que uma desova fosse depositada no pote plástico, para iniciar futuros ensaios. Ocorreu também manejos de fêmeas e machos juntando os nos potes de acordo com as necessidades, para que houvesse desova através da copulação. Tudo foi anotado dia-a-dia em tabelas didáticas e de fácil entendimento. Foi deixado adultos por no máximo 2 dias, com a finalidade de esperar a desova, e coletados com o auxílio de um sugador (canudo plástico envolto por tule em uma das pontas) para que não corresse o risco do adulto morrer, e suas asas serem deterioradas na água do pote. Após obtendo as desovas necessárias para o teste posterior, os mosquitos foram fixados em álcool isopropílico, muitas vezes sem a necessidade de novas desovas, ou remanejo.

A emergência total (%) de indivíduos foi calculada pela soma de mosquitos machos e fêmeas, emergidos no pote plástico dividido pelo número de larvas introduzidas por réplicas (OECD, 2010).

4.9. Análises estatísticas

As análises estatísticas referentes ao tamanho da larva, tamanho da asa, fecundidade e emergência de adultos foram realizadas aplicando o teste Two-Way, análise de variância ANOVA, considerando um dos fatores a geração da amostragem (parental e geração G2) e o outro o local de coleta (seis córregos). Para essa análise foi utilizado o *software* PAST (Hammer et al., 2001) e considerando nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Variáveis físicas e químicas da água

A média das variáveis físicas e químicas da água dos córregos de mata e de cana-de-açúcar está apresentada na Tabela 02.

Tabela 2 - Variáveis físicas e químicas da água: valores médios de pH, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido

Córregos	pH	Temperatura (°C)	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})
Anhumas	7,51	22,8	55,1	5,09
Espraiado	7,9	20,5	16,9	7,6
São Vicente	6,61	22,7	90,3	1,7
Água Sumida	6,06	23,6	67,1	3,6
São João	6,87	23,5	40,7	0,5
Chibarro	6,42	22,1	54,9	3,93
Água Preta	6,3	26,9	31	6,16

Fonte: Elaborada pela autora (2021)

As coletas ocorreram em períodos distintos quanto a suas estações de acordo com dados do INPE (2021), em outubro de 2020 (primavera) observou uma variação de precipitação de 25,1mm a 150 mm de chuva (figura 29). Em janeiro de 2021 (verão) sua precipitação pluviométrica variou de 2,1mm a 10mm (figura 30). Em maio de 2021 (outono) a precipitação pluviométrica foi igual ou menor que 2mm de chuva, período de seca (figura 31). Essa região de estudo possui clima tropical, onde ocorrem chuvas no verão e seca no inverno, com a temperatura média do mês mais quente superior a 26,9°C, e a média mínima de 20,5°C (figura 31).

Figura 29- Dados sobre a precipitação total na primavera

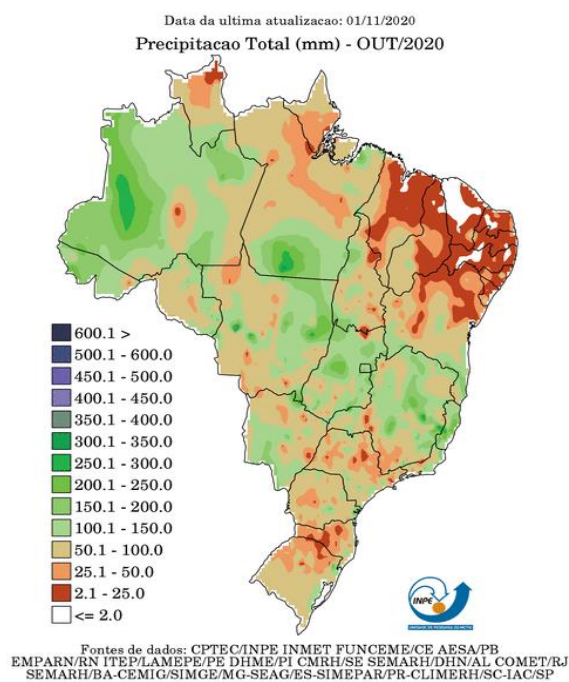


Figura 30- Dados sobre a precipitação total no verão

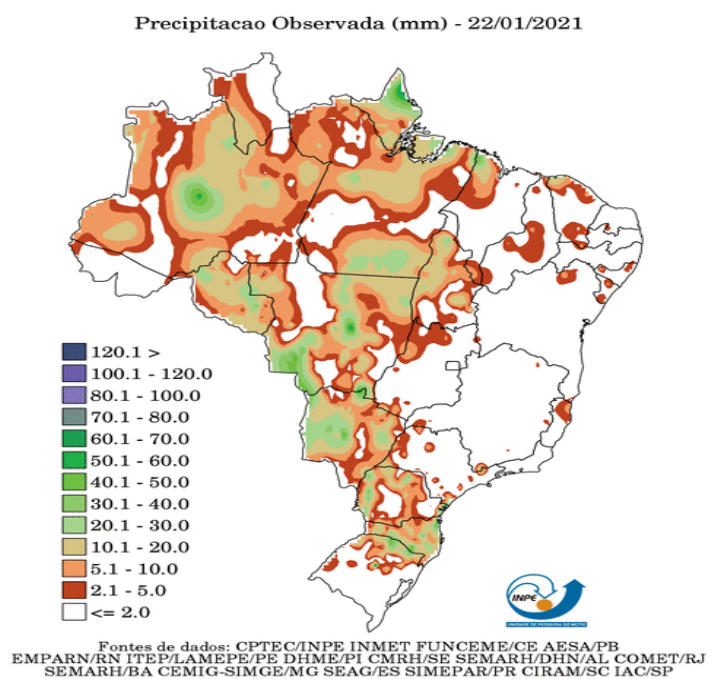
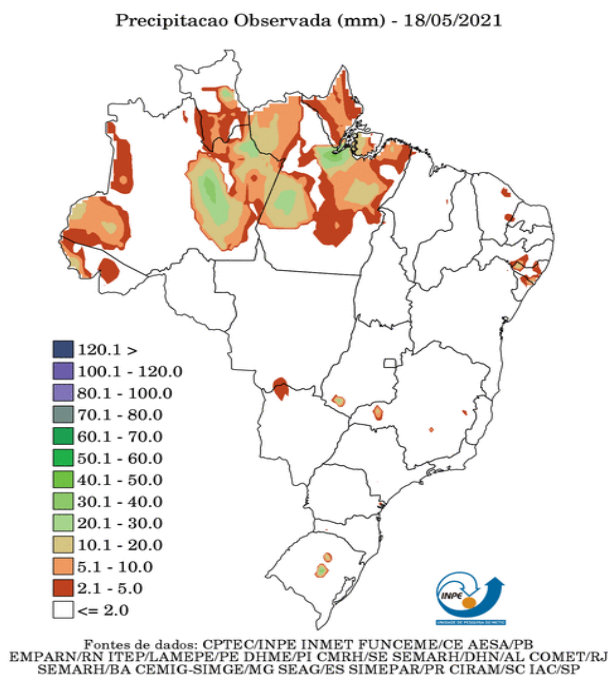


Figura 31- Dados sobre a precipitação total no outono



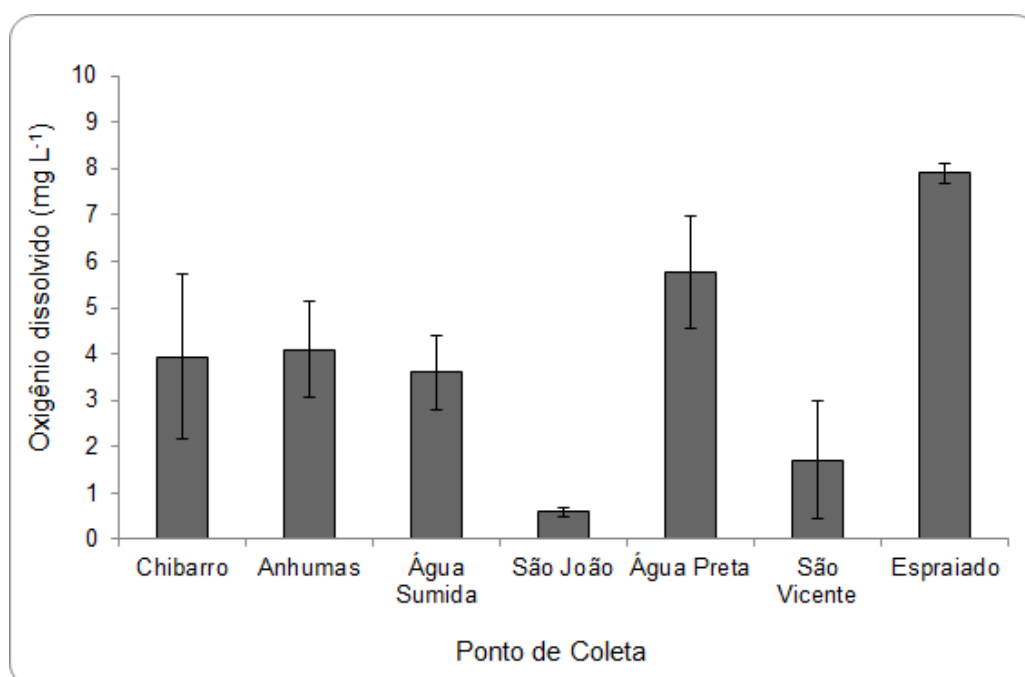
O oxigênio dissolvido (O_2) (figura 32) apresentou concentrações mais baixas nos córregos São João, São Vicente, Água Sumida e Chibarro caracterizados por suas atividades canavieiras, os valores variaram de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para São João a $3,93 \text{ mg L}^{-1}$ para Chibarro. Já para locais que possuem mata ciliar preservada como Espriado e Anhumas (parcialmente preservada) o oxigênio variou de $7,6 \text{ mg L}^{-1}$ para $5,09 \text{ mg L}^{-1}$ enquanto que para o córrego Água Preta caracterizado pela pastagem o oxigênio dissolvido foi de $6,16 \text{ mg L}^{-1}$. O oxigênio dissolvido é vital para seres aquáticos aeróbios, também é o principal parâmetro de caracterização dos efeitos das águas por despejos orgânicos (VON SPERLING, 2014). O pH apresentou valores semelhantes em todos os córregos (Figura 33) variando entre 6,1 a 7,9. Para a condutividade ocorreram grandes variações (figura 34), onde em locais com a cultura açucareira intensa mostrou alto grau de condutividade chegando a ter um valor de $90,36 \mu\text{S cm}^{-1}$ no córrego São Vicente, $67,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ no Água Sumida, $54,9 \mu\text{S cm}^{-1}$ no Chibarro e $40,6 \mu\text{S cm}^{-1}$ no São João, observou-se também que apesar do córrego Anhumas estar presente num local de conservação, possui uma área intermediária com plantio de cana-de-açúcar que altera o curso natural de sua condutividade para um valor de $55,13 \mu\text{S cm}^{-1}$. Água Preta presente em local de pastagem acusou um valor de $35,2 \mu\text{S cm}^{-1}$. E o córrego Espriado que está localizado numa área preservada, com mata ciliar, trouxe nos um valor e $16,96 \mu\text{S cm}^{-1}$ para condutividade elétrica.

A Resolução Conama nº357/2005, indica que a faixa ideal de pH varia de 6,0 a 9,0, sendo que os valores de pH encontrados nos córregos desse trabalho estão de acordo com o exigido para a qualidade da água.

Segundo estudos (CORBI, 2006), o oxigênio dissolvido em concentrações baixas em ambientes com atividade canavieira, pode ser um indicador de stress ambiental nos córregos, por não possuírem mata ciliar e em localidades de atividade agrícola intensa, causando grande prejuízo a riqueza faunística desse local. Tais estudos apontaram também que nutrientes totais dissolvidos (nitrogênio total, fósforo total, nitrato, nitrito e amônia) foram encontrados em concentrações variadas de acordo com cada córrego analisado, os teores de nitrogênio total e fosfato foram encontrados em maiores quantidades em áreas com atividade canavieira. As concentrações de Nitrogênio total variaram de $190\mu\text{g.L}^{-1}$ para o córrego Espreado de (que possui mata ciliar preservada) até $1260\mu\text{g.L}^{-1}$ nos córregos com intensa atividade canavieira.

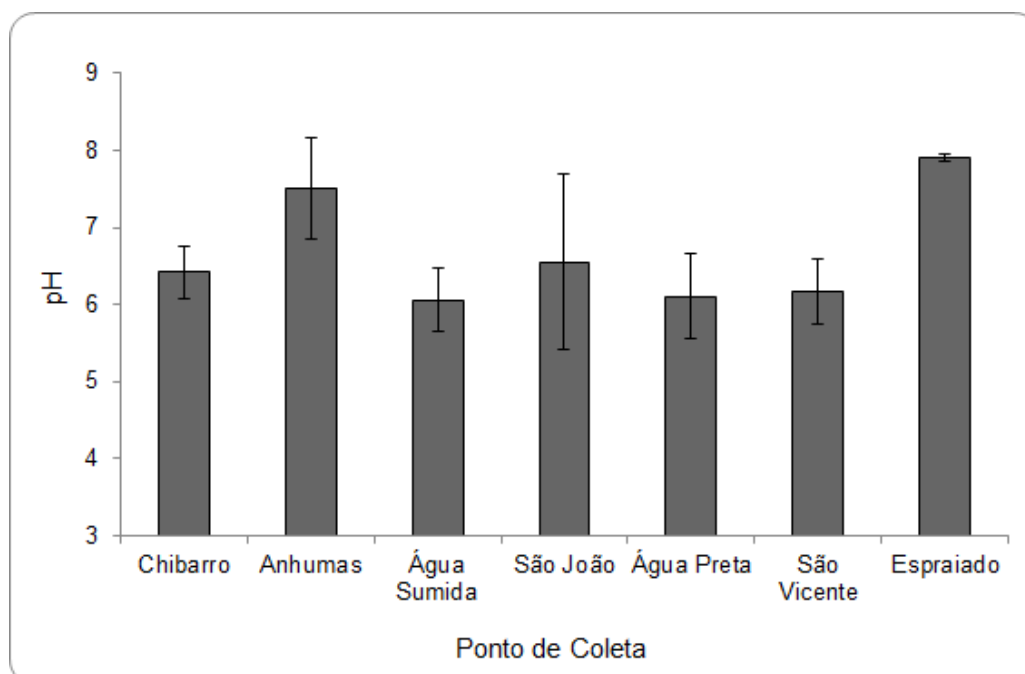
De acordo com estudos anteriores, a condutividade elétrica na água pode ser alterada devido a adição dos agroquímicos (fertilizantes e pesticidas) aumentando as concentrações de íons nos recursos hídricos, sendo que todas essas substâncias poderiam ser evitadas, reduzidas e absorvidas pela vegetação ripária (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008). A flutuação do nível de água de um recurso hídrico faz parte do ecossistema do rio e os organismos aquáticos se desenvolvem de acordo com essas mudanças (Horwitz, 1977), essas mudanças são geralmente rapidamente recolonizadas. A velocidade da correnteza age sobre a natureza do substrato, atuando diretamente sobre a composição das comunidades de macroinvertebrados daquele local (Whitton, 1975).

Figura 32- Valores médios e desvios padrões das concentrações de oxigênio dissolvido nos córregos



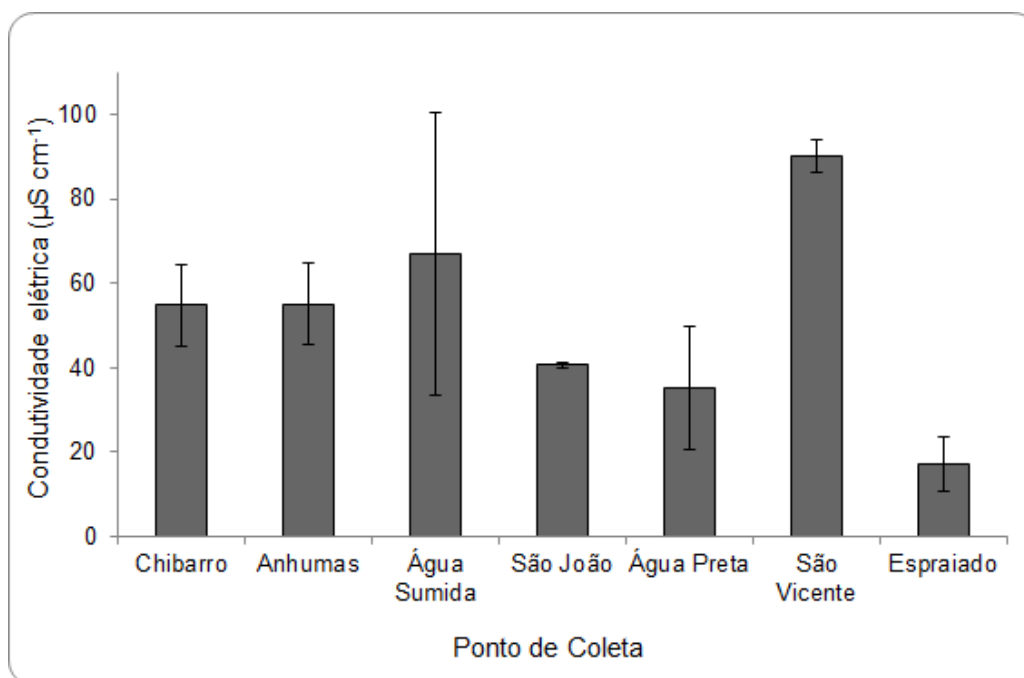
Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Figura 33- Valores médios e desvios padrões de pH (potencial Hidrogeniônico) nos córregos



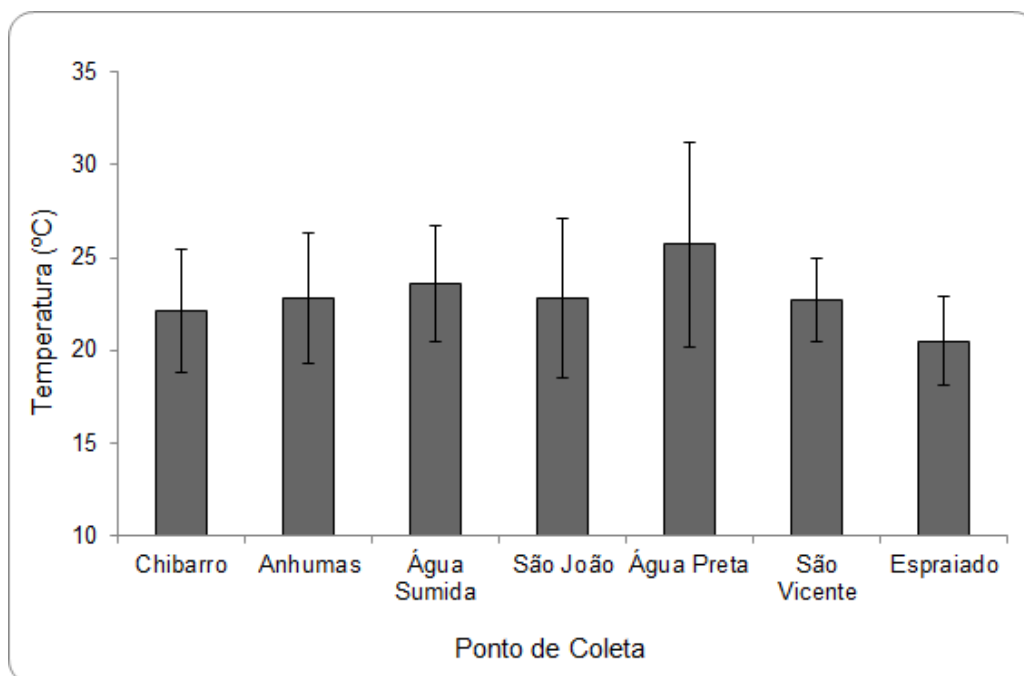
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Figura 34- Valores médios e desvios padrões da condutividade elétrica nos córregos



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Figura 35- Valores médios e desvios padrões da temperatura nos córregos



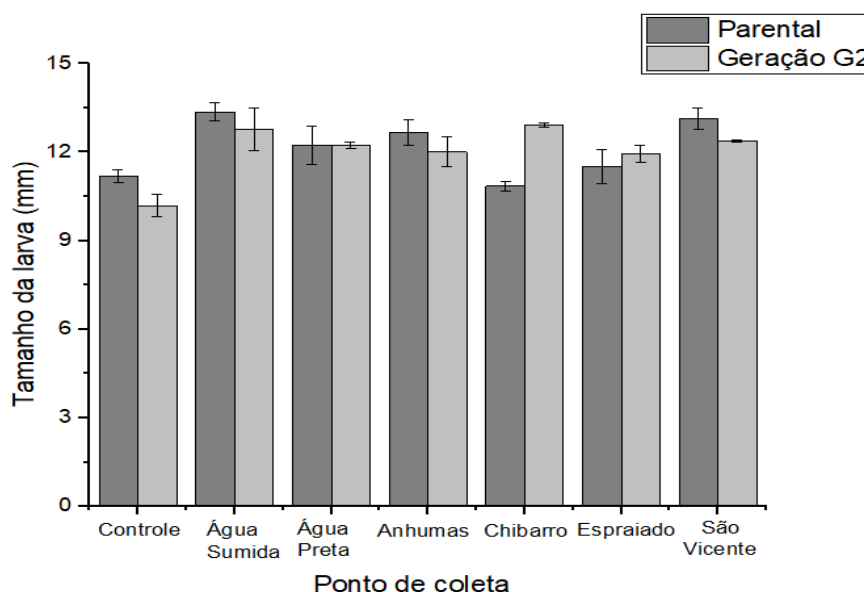
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

5.2. Teste de gerações

5.2.1. Comprimento das larvas

No geral, a média do comprimento das larvas de *C. sancticaroli* amostradas durante o teste de geração foi acima de 10mm. Conforme observado na (Figura 36), de forma geral os comprimentos das larvas na segunda geração foram inferiores ao da geração parental, com exceção do Chibarro e do Espraiado. As larvas amostradas nos diferentes córregos apresentaram comprimento superior ao controle.

Figura 36- Valores médios e desvios padrões do comprimento das larvas *Chironomus sancticaroli* na geração parental e segunda geração



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Segundo o teste Two-Way ANOVA, o fator A (ponto de coleta) se mostrou um fator significativo no comprimento da larva (p-valor de $4,288 \times 10^{-6}$) enquanto o fator B (geração amostrada) não influenciou o comprimento da larva significativamente (p-valor de 0,8947). Quando observamos a interação entre os fatores, podemos observar que os fatores ponto de coleta e tipo de geração em conjunto apresentaram influência significativa sobre a resposta do comprimento da larva. Apesar da análise descrita mostrar que os comprimentos das larvas dos córregos foram superiores ao do controle apenas o córrego Anhumas, Água Sumida e São Vicente se mostraram estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$ no teste *posteriori* de Tukey).

Nos resultados do *posteriori* Tukey para a interação dos fatores temos que as condições de controle parental e Água Sumida parental; Controle G2 e Chibarro G2, Controle G2 e Água Sumida G2, Controle G2 e Água Preta G2 e Controle G2 e São Vicente G2 são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

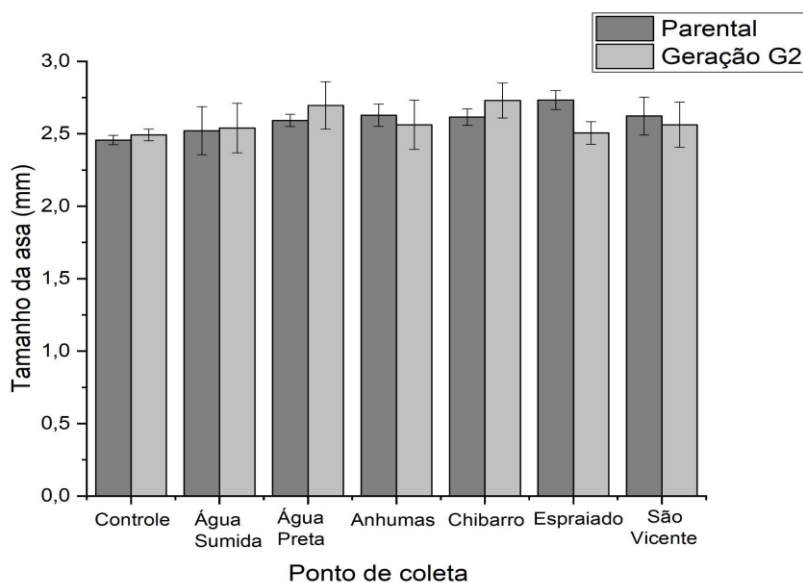
As larvas de Chironomidae possuem adaptações morfológicas, permitindo suportar viver em ambientes de baixas concentrações de oxigênio, devido a presença de Hemoglobina (ESTEVES, 2011). São organismos com alta resistência, pois se desenvolvem favoravelmente tanto em habitats preservados como também em habitats impactados, porém se desenvolvem melhor em locais com abundância orgânica, sendo locais caracterizados por poluições (ROQUE et al., 2000).

Estudos realizados por Felipe et al. (2021), avaliando o ciclo de vida de *C. sancticaroli* com diferentes substâncias, mostraram que a cafeína e o LAS (Benzeno Alcalino Linear) causaram diferença no comprimento das larvas de uma geração para outra. O mesmo estudo ainda analisou amostras ambientais do sedimento de córregos localizados em áreas de cana-de-açúcar e mata e observou comprimento larval variando entre 5 e 9 mm.

5.2.2. Comprimento da asa e fecundidade

No geral, a média do comprimento da asa das fêmeas de *C. sancticaroli* amostradas durante o teste de geração foi acima de 2,46 mm (Figura 37). O comprimento da asa na segunda geração foi maior nos córregos de cana-de-açúcar e menor nos córregos de mata.

Figura 37 - Valores médios e desvios padrões do comprimento da asa da fêmea de *Chironomus sancticaroli* na geração parental e segunda geração

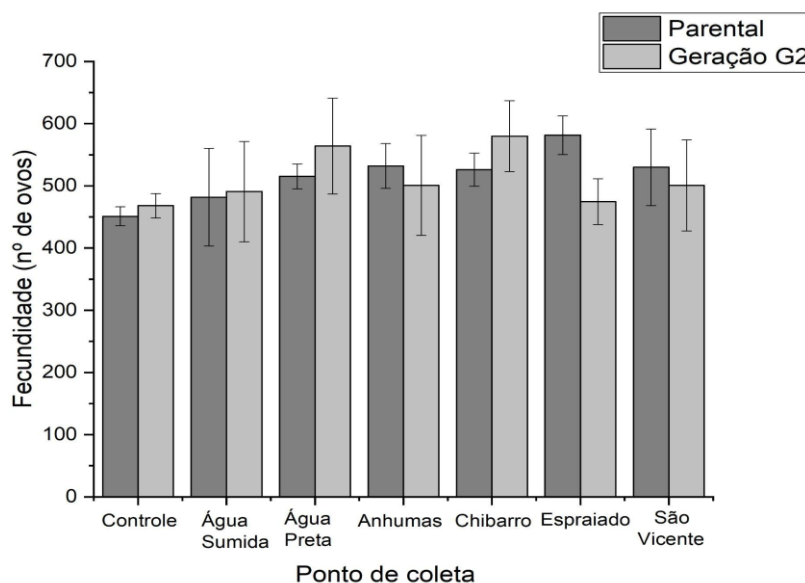


Fonte: Elaborada pela autora (2021)

De acordo com o teste Two-Way ANOVA aplicado, o fator A (ponto de coleta) foi significativo em relação ao comprimento da asa (p -valor de $9,46 \times 10^{-12}$). Os resultados do posteriori Tukey indicaram que o controle foi significativamente diferente de todos os córregos, exceto Água Sumida. Por outro lado, o fator B (geração amostrada) não influenciou significativamente o comprimento da asa (p -valor de 0,4489).

Em relação à interação entre os fatores A e B, observa-se que o ponto de coleta e o tipo de geração em conjunto apresentaram influência significativa sobre a resposta comprimento da asa das fêmeas de *C. sancticaroli* (p -valor de $4,91 \times 10^{-09}$). Os resultados do posteriori Tukey para a interação dos fatores indicaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as condições: Controle parental e todos os córregos parental, exceto Água Sumida; Controle G2 e Água Preta G2, Chibarro G2; Água Sumida parental e Espraiado parental; Água Sumida G2 e Água Preta G2, Chibarro G2; Água Preta parental e Espraiado parental; Água Preta G2 e Anhumas G2, Espraiado G2, São Vicente G2; Chibarro G2 e Anhumas G2, Espraiado G2, São Vicente G2; Espraiado parental e Espraiado G2.

Figura 38- Valores médios e desvios padrões da Fecundidade da fêmea de *Chironomus sancticaroli* na geração parental e segunda geração



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Segundo o teste Two-Way ANOVA, o fator A (ponto de coleta) se mostrou um fator significativo para a fecundidade (p-valor de $8,66 \times 10^{-12}$), indicando pelo posteriori Tukey, que o controle foi significativamente diferente de todos os córregos, exceto Água Sumida. Por outro lado, o fator B (geração amostrada) não influenciou significativamente a fecundidade (p-valor de 0,4326).

Em relação à interação entre os fatores A e B, observa-se que o ponto de coleta e o tipo de geração em conjunto apresentaram influência significativa na fecundidade (p-valor de $4,91 \times 10^{-09}$). Os resultados do posteriori Tukey para a interação dos fatores indicaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as condições: Controle parental e todos os córregos parental, exceto Água Sumida; Controle G2 e Água Preta G2, Chibarro G2; Água Sumida parental e Espraiado parental; Água Sumida G2 e Água Preta G2, Chibarro G2; Água Preta parental e Espraiado parental; Água Preta G2 e Anhumas G2, Espraiado G2, São Vicente G2; Chibarro G2 e Anhumas G2, Espraiado G2, São Vicente G2; Espraiado parental e Espraiado G2.

Em relação a fecundidade, o número de ovos produzidos pelas fêmeas de *C. sancticaroli* amostradas durante o teste de geração foi acima de 450 ovos (Figura 38),

sendo que a produção de ovos foi maior na segunda geração nos córregos próximos às plantações de cana-de-açúcar (Água Sumida, Água Preta e Chibarro).

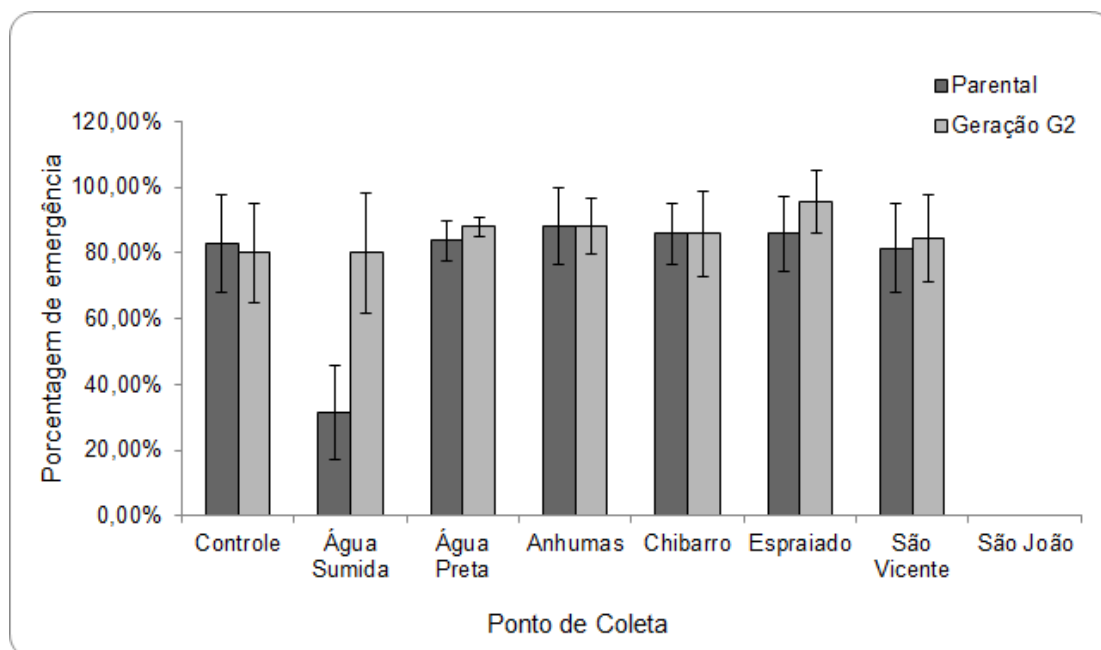
No geral, o comprimento das asas das fêmeas de *C. sancticaroli* ficou próximo aos valores observados para a espécie no controle, que variam entre 2,34 e 3,51 mm, com média de 2,98 mm (TRIVINHO-STRIXINO, 1980). Estudos realizados nos mesmos córregos também mostraram uma queda no comprimento da asa de *C. sancticaroli* nos córregos de mata, da geração P para a geração F1 (FELIPE et al., 2021). Essa redução no comprimento da asa nos córregos de mata pode comprometer a fecundidade das fêmeas e posteriormente causar uma redução da prole das gerações seguintes.

Estudos mostraram que para *Chironomus sancticaroli*, foi encontrado uma grande variação de ovos em fêmeas, variando de 500 até 1045 ovos, com valor médio de 744 ovos por fêmea (Fonseca e Rocha, 2004; Strixino-Strixino, 1982). Em amostras ambientais de cana-de-açúcar e mata, foi encontrada uma produção variando entre 454 a 594 ovos na geração P, para a espécie *C. sancticaroli*, e uma produção entre 372 e 515 ovos na geração F1 (FELIPE et al., 2021).

5.2.3. Emergência de adultos

Após o tempo de crescimento das larvas de 1º instar, os indivíduos que emergiram para a fase adulta eram capturados e a porcentagem de emergência para cada tratamento foi registrada e compilada em gráfico, conforme o exposto na (Figura 39). A porcentagem de emergência observada na geração parental foi semelhante à observada para a G2, exceto no tratamento com amostras do córrego água sumida, que apresentou crescimento no percentual de emergência da geração parental para a G2. Nesse gráfico, ressalta-se o percentual nulo de larvas emergidas no córrego São João, provavelmente devido à sua toxicidade à indivíduos da espécie de *Chironomus sancticaroli*. Dessa forma nenhum organismo sobreviveu para que fosse coletado o comprimento da larva, comprimento de asa ou porcentagem de emergência.

Figura 39- Valores médios e desvios padrões da Emergência de adultos de *Chironomus sancticaroli* na geração parental e segunda geração



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Por meio dos valores de significância obtidos por meio da aplicação do teste estatístico Two-Way ANOVA aplicado, o fator A (ponto de coleta) foi estatisticamente influenciador no percentual de emergência das larvas (p -valor de $2,118 \times 10^{-56}$). Os resultados do posteriori Tukey indicaram que os dados de emergência do controle foram significativamente diferentes somente dos dados dos córregos São João e Água Sumida. Da mesma forma, o fator B (geração amostrada) influenciou significativamente o percentual de emergência de adultos (p -valor de $1,193 \times 10^{-05}$).

Em relação à interação entre os fatores A e B, observa-se que o ponto de coleta e o tipo de geração em conjunto apresentaram influência significativa sobre os dados de emergência de adultos do inseto *C. sancticaroli* (p -valor de $1,245 \times 10^{-11}$). Os resultados do posteriori Tukey para a interação dos fatores indicaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as condições: Controle parental, Água Sumida parental e São João parental; Controle G2 e São João G2; Água Sumida parental e geração parental de todos os córregos; São João parental e geração parental de todos os córregos; São João G2 e geração G2 de todos os córregos. Observa-se que a estatística confirmou a diferença significativa entre a geração parental do córrego Água Sumida e a geração G2 do mesmo córrego (p -valor de $5,107 \times 10^{-14}$), nenhuma outra diferença estatística foi observada entre as gerações parental e G2 dos demais córregos ou controle.

A análise da emergência de adultos se faz importante, pois reduções ou atrasos da emergência pode influenciar negativamente na manutenção da população da espécie de *Chironomus* ao longo do tempo (RAKOTONDRAVELO et al., 2006). Pinto et al. (2021) observaram extinção da população de *C. sancticaroli* ainda na primeira geração em algumas concentrações do inseticida fipronil. Vários estudos têm utilizado esse parâmetro para avaliar os efeitos tóxicos de várias substâncias e amostras ambientais em *Chironomus* (CASTRO, 2020; PINTO et al., 2021; CAMPOS et al., 2019).

6. CONCLUSÃO

Por meio dos testes de ecotoxicidade foi possível observar diferentes respostas da toxicidade do sedimento de cana-de-açúcar em várias fases do ciclo de vida da espécie *C. sancticaroli*. O teste de geração permitiu expor os organismos à uma situação prolongada, por mais de uma geração e observar respostas e comportamentos à uma condição estressante, que não seriam possíveis de serem analisadas nas exposições de curto prazo (exposições agudas).

Todos os parâmetros analisados (comprimento de larva, comprimento da asa, fecundidade e emergência de adultos) foram significativamente diferentes entre o controle e os córregos amostrados. Por outro lado, entre as gerações (P e G2) houve diferença significativa apenas em relação a emergência de adultos de *C. sancticaroli*.

Cabe ressaltar a importância da preservação da mata ciliar como barreira de proteção dos recursos hídricos contra a entrada de produtos químicos oriundo dos plantios agrícolas e do uso de teste de gerações como ferramenta de biomonitoramento.

Para o córrego São João, localizado em área de cultivo de cana-de-açúcar, a contaminação do sedimento deve ser investigada com maior cautela, pois este se mostrou com alto grau de toxicidade, levando a letalidade de todos os organismos expostos ao sedimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Site: **Efeitos de herbicidas Saúde Ambiental (365saude.com.br)**, disponível em 07/10/2021.

ACAYABA, R. D.; **Ocorrência de agrotóxicos usados na cana-de-açúcar em corpos d'água do Estado de São Paulo**. Limeira – SP: [s. n.], 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT NBR 15469: Ecotoxicologia – Coleta, preservação e preparo de amostras**. ABNT, Rio de Janeiro, 22 p., 2015

ARANA, S; RODRÍGUEZ, Y.A.; GUEDES, T. A.; MARCATO, A.C.C.M.; CORREIA, J. E.; FONTANETTI, C. S.; **Peixes como bioindicadores do impacto no ambiente aquático induzido por agrotóxicos empregados no cultivo da cana-de-açúcar**. Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica, editora: canal 6. Unesp Rio Claro, cap. 12, 229p. 2017.

ARAUJO, MAYCON A.; LEITE, MARILAINÉ C. M.; CAMARGOS, LILIANE S.; MARTINS, ALINE R. **Tolerance evaluation and morphophysiological responses of *Astronium graveolens*, a native Brazilian Cerrado, to addition of lead in soil**. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, v. 195, JUN 1 2020

ARENAS, L. T.; SIMON, N. M.; GUSHIKEM, Y.; COSTA, T. M. H.; LIMA, E. C.; BENVENUTTI, E.V. **Eclética Química**, v. 31, p. 53-58, 2006.

ARIAS, A. R. L. et al. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos**. Ciência & Saúde Coletiva, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

AGEITEC- **AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA**, 25 de setembro 2020. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT1.html>

AGEITEC- AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, 27 de janeiro 2020. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_20_3112006152934.html

BAPTISTA, D. F., BUSS, D. F., EGLER, M. **Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos contaminados por agrotóxicos. É Veneno ou é Remédio**, p. 157-175, 2003.

BARTH, V. G.; BIAZON, A. C. B. **Complicações decorrentes da intoxicação por organofosforados**. SaBios: Rev. Saúde e Biol., v. 5, n. 2, p. 27-33, 2010.

BEGA, J. M.; **Uso da cafeína como indicador de poluição por esgoto doméstico em corpos d'água urbanos**, 2021

BELLO, V.; BELBASIS, L.; TZOULAKI, I.; EVANGELOU, E.; IOANNIDIS, J.P. **Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses**. Park. Relat. Disord. 2015

BERNEGOSI, A. C. et al. ***Chironomus sancticaroli* generation test: A new methodology with a Brazilian endemic insect**. MethodsX, v. 6, p. 92-97, 2019.

BLAISE, C. 1984. **Introduction to ecotoxicological concepts. Proceedings of Biological Testing and Hazard Assessment**. Environmental Canada, October 20-21, 1982. Pp. 11-47

BRITO, A. L., ANDRADE, C. L.T. **Qualidade da água na agricultura e no ambiente**. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, v31, n.259, p 50-57, nov/dez. 2010.

CAMPOS, D., SILVA, A. R. R., LOUREIRO, S., GRABICOVÁ, K., STAŇOVÁ, A. V., SOARES, A. M., PESTANA, J. L. **Two-generational effects of Benzophenone-3 on**

the aquatic midge *Chironomus riparius*. Science of The Total Environment, v. 669, p. 983-990, 2019

CAIRNS, J. Jr. & NIEDERLEHNER, B. R. Ecological Toxicity Testing. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. 228p, 1995.

CALIJURI, M. C. et al. **Engenharia Ambiental conceitos, tecnologia e gestão**. Editora Elsevier Ltda, p. 132, 2013.

CALLISTO, M.; MORETTI, M.; GOULART, M. **Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. Revista Brasileira de recursos hídricos**. Volume 6. N. 1. p. 71-78, 2001.

CARDOSO, J. T. et al. **Monitoramento da qualidade da água no planalto sul de SC, através da comunidade de macroinvertebrados bentônicos**. Revista UNIPLAC, v. 5, n. 1, 2017.

CASTRO, G. B. **Efeitos tóxicos do microplástico polietileno em *Allonais inaequalis*, *Chironomus sancticaroli* e *Daphnia magna* sob exposições convencionais e de estresse**. 2020. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. 2020.

CETESB. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras**. CEDOC/Biblioteca. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2011.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Protocolo para o biomonitoramento com as comunidades bentônicas de rios e reservatórios do estado de São Paulo**. São Paulo, p. 113, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2020**. Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília,

CORBI, J. J. **Influência de práticas de manejo de solo sobre os macroinvertebrados aquáticos de córregos: ênfase para o cultivo de cana-de-açúcar em áreas adjacentes.** 2006, 92p., Tese (Doutorado)- Universidade Federal de São Carlos Centro de ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar, São Carlos, 2006.

CORBI, J. J. et al. **Environmental evaluation of metals in sediments and dragonflies due to sugarcane cultivation in neotropical streams.** Water, air, and soil pollution, v. 195, n. 1-4, p. 325-333, 2008.

CORBI, J. J. et al. **Utilização de quitosana na adsorção de metais em sedimentos de córregos contaminados: biorremediação das áreas impactadas e seu efeito em larvas de *Chironomus xanthus*,** 2016

CORBI, J. J. et al. ***Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) as a sensitive test species: can we rely on its use after repeated generations, under laboratory conditions?** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 103, n. 2, 2019.

CORBI, J. J. et al. ***Chironomus sancticaroli* generation test applied to chemical contaminants and freshwater sediment samples.** Environmental Science and Pollution Research, v. 28, n. 29, 2021.

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

CUMMINS, K.W.; WILZBACH, M.A. **Field Procedures for the Analysis of Functional Feeding Groups in Stream Ecosystems;** Contribution 1611; Appalachian Environmental Laboratory, University of Maryland: Frostburg, MD, USA, 1985.

DANCE, K. W. & HYNES, H. B. B. Some Effects of Agricultural Land Use on Stream Insects Communities. Environ. Poll. Ser. A 22: p. 19-28. 1980.

DELLAMATRICE, Priscila Maria; MONTEIRO, Regina Teresa Rosim. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 18, n. 12, p. 1296-1301, 2014.

DORNFELD, C. B. **Utilização de *Chironomus* sp. (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais. 2006.** 239f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

DOMINGUES, E.; FERNANDEZ, H.R. **Macroinvertebrados aquáticos bentônicos sudamericanos: sistemática y biología.** Tucuman, Argentina: Ed. Fundación Miguel Lillo, P. 411-468, 2008.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia, Editora Interciência,** p. 117, 2011.

FELIPE, M.C., BERNEGOSI, A.C., CARDOSO-SILVA, B. N., DELL'ACQUA, M.M., CORBI, J. J. ***Chironomus sancticaroli* generation test applied to chemical contaminants and freshwater sediment samples.** *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-14, 2021.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados.** 1997. 211f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. **Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae).** *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 16, n. 2, p. 153-161, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). SGI 2.5 – **Introdução ao Sistema de Informações Geográficas – SGI.** Imagem Geosistemas São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS (IBAMA). **Histórico de comercialização 2000-2017**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-deagrotoxicos>>. Acesso em: 22 agosto de 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS (IBAMA). **Os 10 ingredientes ativos mais vendidos**. <<http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-deagrotoxicos>>. Acesso em: 22 ago de 2019.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis**. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. Disponível em: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm, 2001.

HORWITZ, R. J. **Temporal variability patterns and the distributional patterns of stream fishes**. *Ecological Monographs*, v. 48, p. 307-321, 1977.

KIM, K. et al. **Exposure to pesticides and the associated human health effects**. *Science of the Total Environment*, v. 575, p. 525-535, 2016.

KING, K. R. **Effects of Herbicides on Zebrafish Embryo Development and Viability**. 2019.

KOLPIN, D. W.; MEYER, M. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U. S. Streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002.

MADDEN, C. P. et al. **Deformities in chironomid larvae as indicators of pollution (pesticide) stress**. *Aquatic Ecology*, v. 26, n. 2, p. 551-557, 1992.

MELLO, J. L, CARDOSO, B. N., COLOMBO-CORBI, V., CORBI, J. J. **Effects of Agrochemicals on Freshwater Macroinvertebrates: Challenges and Perspectives**

from Southeastern Brazil. Limnology and Oceanography Bulletin, v. 28, n. 1, p. 1-4, 2019.

MUGNAI, R.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. **Manual de Identificação de Macroinvertebrados Aquáticos do Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro: Technical Books Editora, p. 148-149, 2010.

NEGREIROS, S. **CETESB Conclui inventário e prepara plano de ação, saneamento ambiental.** n. 46, p. 30-34, 1997.

NELSON, D.L. et al. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6ª Edição, p. 57-58, 2014.
ODUM, E. *Ecologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2ª ed., 1988. p. 433

ODUM, E. **Ecologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2ª ed.; 1988. 433 pp.

ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT -
OECD. **Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment.** OECD Publishing, 2010.

OLIVER, D. **Life history of the Chironomidae.** Annual Review of Entomology, v. 16, n. 1, p. 211-230, 1971

OLIVEIRA, R. M. S.; TORNISIELO, V. L. **Determinação de resíduos organoclorados no leite bovino na bacia do Cerveiro, Piracicaba, SP.** In: VI Encontro de Ecotoxicologia, pg. 95. 2000. Anais

PALLOTTINI, M.; CAPPELLETTI, D.; FABRIZI, E.; GAINO, E.; GORETTI, E.; SELVAGGI, R.; CEREGHINO, R. **Macroinvertebrate functional trait responses to chemical pollution in agricultural-industrial landscapes.** River Res. Appl. 2017, 33, 505–513

PAUMEN, M.L.; M.H. KRAAK & C.A. GESTEL. 2008. **Life cycle responses of the midge *Chironomus riparus* to polycyclic aromatic compound exposure.** Environmental Pollution 152 (1): 225-232. doi: 10.1016/j.envpol.2007.04.027

PELÁEZ-RODRÍGUEZ, M. **Avaliação da qualidade da água da bacia do Alto Jacaré-Guaçu/SP (Ribeirão do Feijão e Rio do Monjolinho) através de variáveis físicas, químicas e biológicas.** 2001. 175p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

PINTO, T. J. S.; ROCHA, G. S., MOREIRA, R. A., DA SILVA, L. C. M., YOSHII, M. P. C., GOULART, B. V., MONTAGNER, C. C., DAAM, M. A., ESPINDOLA, E. L. G. **Multi-generational exposure to fipronil, 2, 4-D, and their mixtures in *Chironomus sancticaroli*: Biochemical, individual, and population endpoints.** Environmental Pollution, v. 283, p. 117384, 2021

PLAA, G. L. **Present status: toxic substances in the environment.** Can. J. Physiol. Pharmacol., 60: 1982, 1010-1016.

PRINTES, L. B.; FERNANDES, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G. **Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 74, n. 3, p. 424-430, 2011.

RAKOTONDRAVELO, M. L., ANDERSON, T. D., CHARLTON, R. E., ZHU, K. Y. **Sublethal effects of three pesticides on larval survivorship, growth, and macromolecule production in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae).** Archives of environmental contamination and toxicology, v. 51, n. 3, p. 352-359, 2006

RAMOS, J.J.; GONZÁLEZ, M. J.; RAMOS, L. **Miniaturised sample preparation of fatty foodstuffs for the determination of polychlorinated biphenyls.** J. Sep. Sci., v. 27, p. 595, 2004.

RAND, G. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 2 ed. [s.l.] CRC Press, 1995

RASBAND, W. **ImageJ**. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/>>.2018.

RIGOTTO, R. M., VASCONCELOS, D. P., ROCHA, M. M. **Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública**. Cadernos de Saúde Pública, v. 30, p. 1360-1362, 2014.

RODRIGUES, B. K. **Caracterização ambiental da bacia do Alto Jacaré-Guaçu (experimentos laboratoriais e *in situ*): elaboração de sedimentos sintéticos para avaliação da toxicidade do cádmio**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, 2011.

ROQUE, F. O. et al. **Untangling associations between chironomid taxa in neotropical streams using local and land scape filters**. Freshwater Biology, v. 55, n. 4, p. 847-865, 2010.

ROSENBERG, D.M. **Freshwater biomonitoring and Chironomidae**. Netherlands Journal of Aquatic Ecology, v. 26, p. 101-122, 1992.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. **Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. In: Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. New York: Chapman and Hall, 1993.

SANTOS, A. **Distribuição de metais no reservatório de captação de água superficial Anhumas Américo Brasiliense- SP**. USP.1999. 147p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

SARAIVA, A. S. **Avaliação da toxicidade de Tiametoxam, Ciproconazol e Paraquat em invertebrados aquáticos**. 2016. 91f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2016.

SAULINO, Hugo Henrique Lanzi. **Entomofauna aquática do Ribeirão das Anhumas (Bacia hidrográfica do Rio Mogi-Guaçu, SP): influência do represamento e do uso da terra na estrutura da comunidade.** 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SCHIESARI, Luis Cesar; CORREA, Décio T. **Consequences of agroindustrial sugarcane production to freshwater biodiversity.** *Global Change Biology. Bioenergy*, Chichester, n. ju 2015, p. on-line, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/gcbb.12279> > DOI: 10.1111/gcbb.12279.

SHORTLE, J. S., D. G. ABLER and M. RIBAUDO. **Agriculture and water quality: the issues.** In **Environmental Policies for Agricultural Pollution Control.** CABI Publishing, London, 2001

SILVEIRA, M. P. **Aplicação do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em rios.** Embrapa Meio Ambiente, Documentos 36, 68p, 2004.

SIQUEIRA, G.W.; BRAGA, E. S. **Avaliação da dinâmica e da biodisponibilidade de Zn, Ni, Co, Pb para a biota partir de sedimentos da plataforma continental do Amapá, Nordeste da Amazônia.** *Ecotoxicologia perspectivas para o século XXI.* Rima editora. São Carlos, p. 115-126, 2000.

SISINNO, C. L.S.; OLIVEIRA-FILHO, C. **Princípios da Toxicologia Ambiental.** EDITORA INTERCIÊNCIA, Rio de Janeiro. p 77-91, 2013.

SODRÉ, F.F.; MONTAGNER, C.C.; LOCATELLI, M.A.F.; JARDIM, W.F. (2007) **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil).** *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 2, n. 2, p. 187-196.

SOLIS, M. et al. **Aquatic macroinvertebrate assemblages are affected by insecticide applications on the Argentine Pampas.** *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 148, p. 11-16, 2017.

SPADOTTO C. A.; RIBEIRO W. C.; **Gestão de resíduos na agricultura e agroindústria.** - Botucatu : FEPAF, 2006

STRIXINO, S. T. & STRIXINO, G. **Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae).** *Revta bras. Ent.*, 26(2): 183-189, 1982b.

SURIANO, M. T.; FONSECA-GESSNER, A. A. **Structure of benthic macroinvertebrate assemblages on a gradient of environmental integrity in Neotropical streams.** *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 25, n. 4, p. 418-428, 2013.

TADEI, R. et al. **Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*.** *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 3277, 2019.

TRIVINHO-STRIXINO, S. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp. n. (Diptera: Chironomidae).** 182p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 1980.

TRIVINHO-STRIXINO, S. **Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) from São Paulo State, Southeast of Brazil.** *Biota Neotropica*, v. 11, p. 675-684, 2011.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. **Larvas de Chironomidae (Diptera) do Estado de São Paulo: Guia de identificação e diagnose de gêneros.** UFSCar, São Carlos, 227 pp, 1995.

TOWNSEND, C.R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em ecologia.** 3ª EDIÇÃO. EDITORA ARTMED, V.12, P. 481-486, 2010.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. M. **Limnologia.** Oficina de Textos. 632p. 2008.

UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR – UNICA. **Produção**. 2018. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br> >. Acesso em: 20, setembro. 2021.

VASCONCELLOS P. R. O.; RIZZOTTO M. L. F.; OBREGÓN P. L.; ALONZO H.G.A.; **Exposição a agrotóxicos na agricultura e doença de Parkinson em usuários de um serviço público de saúde do Paraná, Brasil**. *Cad Saúde Colet*, 2020 Ahead of Print. <https://doi.org/10.1590/1414-462X202028040109>

Trabalho realizado no Hospital Universitário do Oeste do Paraná e Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) - Cascavel (PR), Brasil.

VALDOVINOS, C.; FIGUEROA, R. **Benthic community metabolism and trophic conditions of four South American lakes**. *Hydrobiologia*. v. 429, p. 151-156, 2000.

VIGNA, C. R. M.; MORAIS, L. S. R.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides**. *J. Chromatogr. A*, v. 1114, p. 211-215, 2006

VIVEIROS, W. ***Chironomus sancticaroli* – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Ciências – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Volume 1. Princípios do Tratamento ecológico de águas residuárias**, p. 15, 2014.

WHITTON, B. A.; *River ecology*. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, 725p, 1975

WINNER, H. E.; BOESEL, M. W.; FARREL, M. P. **Insect Community Structure as na Index of Heavy-Metal Pollution in Lotic Ecosystems**. *Ca. J. Fish. Aquat. Sci.*37: p. 647-655. 1980.

ZAGATTO, P.A. BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. RiMa, São Carlos, SP, Brazil, p. 486, 2014.

ZIOLLI, R. L.; BARRETO; A. S. & JARDIM; W. F. (1995) **Estudo Preliminar da Composição da Água de Chuva na Região de Campinas – SP**. In: 18ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química e 7º encontro Brasileiro de fotoquímica e fotobiologia. Anais.