

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ENGENHARIA AMBIENTAL

**MARIA PAULA CARDOSO YOSHII**

**Efeitos do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil, isolados e em mistura, em  
macrófitas aquáticas e fauna associada**

São Carlos  
Estado de São Paulo  
2022



**MARIA PAULA CARDOSO YOSHII**

**Efeitos do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil, isolados e em mistura, em  
macrófitas aquáticas e fauna associada**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos,  
da Universidade de São Paulo, como requisito à  
obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental.

**Orientador: Prof. Dr. Evaldo L. G. Espíndola**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Michiel A. Daam**

Versão corrigida

São Carlos  
Estado de São Paulo  
2022

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

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

C268      Cardoso Yoshii, Maria Paula  
            Efeitos do herbicida 2,4-D e do inseticida  
            fipronil, isolados e em mistura, em macrófitas  
            aquáticas e fauna associada / Maria Paula Cardoso  
            Yoshii; orientador Evaldo Luiz Gaeta Espindola;  
            coorientador Michiel Adriaan Daam. São Carlos, 2022.

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

            1. Cana-de-açúcar. 2. agrotóxicos. 3.  
            ecotoxicologia aquática. 4. macrófitas aquáticas. 5.  
            macroinvertebrados. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Tecnóloga **MARIA PAULA CARDOSO YOSHII**.

Título da tese: "Efeitos do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil, isolados e em mistura, em macrófitas aquáticas e fauna associada."

Data da defesa: 18/04/2022.

### Comissão Julgadora

### Resultado

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

Aprovada

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

Aprovada

Profa. Dra. **Odete Rocha**  
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Dra. **Fernanda Cristina Massaro**  
(Biotox Análises Ambientais)

Aprovada

Dra. **Denise Tieme Okumura**  
(Biotox Análises Ambientais)

Aprovada

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

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Dedico esse trabalho à pessoa mais importante da  
minha vida. A quem sempre me amou incondicionalmente,  
esteve ao meu lado e me incentivou: minha amada  
Avó Juraci (*in memoriam*).  
“*De todo o amor que eu tenho, metade foi tu que me  
deu...*”

(Dona Cila, composição: Maria Gadú)

## Agradecimentos

Aos meus orientadores professores Evaldo L. G. Espíndola e Michiel Adriaan Daam pela orientação, aprendizados e amizade durante o curso de doutorado.

À Dra. Gertie Arts e o *team Environmental Risk Assessment da Wageningen University & Research* pela recepção e ensinamentos durante meu estágio no exterior.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de doutorado durante o desenvolvimento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche para o desenvolvimento da pesquisa na Wageningen University & Research, em Wageningen, Países Baixos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro por meio do Projeto temático FAPESP nº 15/18790-3, intitulado “*Environmental effects of the pasture sugarcane conversion and pasture intensification*”.

Aos meus colegas do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (CRHEA/EESC/USP) pelos ensinamentos e risadas. Em especial à Dayane Oliveira, Isabelle Baima, Maria Carolina Triques, Marina Reghini e Dr. Thandy Pinto. Vocês fizeram os últimos anos mais leves e felizes. A microscopia nunca mais será a mesma.

À minha família, que direta ou indiretamente sempre esteve torcendo por mim.

Às minhas inesquecíveis Fer, Dê, Lidi e Ana, pelas risadas, cada troca, cada copo, cada conselho e carinho divididos nesses anos de São Carlos. Amo vocês migas!

Às minhas melhores amigas Bia e Popis por todo suporte, conselhos, motivação e amor nos bons e maus momentos.

Por fim, ao Joaquim, meu amor incondicional de quatro patas e ao Charles, por cada incentivo, torcida, carinho e amor.

“Ensinou a amar a vida, não desistir de lutar, renascer da derrota, renunciar às palavras e pensamentos negativos. Acreditar nos valores humanos e a ser otimista. Aprendeu que mais vale tentar do que recuar. Antes acreditar que duvidar, o que vale na vida não é o ponto de partida e sim a nossa caminhada.” Cora Coralina.

## RESUMO

YOSHII, M. P. C. **Efeitos do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil, isolados e em mistura, em macrófitas aquáticas e fauna associada.** Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental – PPG-SEA/EESC-USP, 2022.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e etanol. Essa produção, no entanto, requer o uso de diversos insumos para a produção em escala destas monoculturas, destacando-se o herbicida 2,4-D e o inseticida fipronil como os agrotóxicos mais utilizados nesta cultura, que assim como outros agrotóxicos podem comprometer diretamente e indiretamente a saúde humana e o meio ambiente. A presente tese avaliou, em laboratório e em estudos de campo (mesocosmos), os efeitos do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil (formulações comerciais: 2,4-D: DMA® 806 BR (Dow AgroSciences Industrial Ltda., Brasil) e fipronil: Regent® 800 WG (BASF S.A), isolados e em misturas, nas macrófitas aquáticas *Eichhornia crassipes*, *Glyceria máxima*, *Landoltia punctata*, *Myriophyllum aquaticum*, *Myriophyllum spicatum* e *Pistia stratiotes*. Os resultados demonstraram que as concentrações reportadas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) em 2018 de 2,4-D (366 µg/L) e fipronil (465 µg/L) afetam as macrófitas *L. punctata* e *M. aquaticum* inibindo o crescimento em até 44% e biomassa em 68% em comparação ao controle. As macrófitas *G. maxima* e *M. spicatum* (típicas de região temperada) quando expostas ao 2,4-D, declínio em biomassa e crescimento são observados. No entanto, a combinação de concentrações ambientalmente reais testadas de fipronil e 2,4-D em mesocosmos afetam o crescimento do caule e das raízes das macrófitas *E. crassipes* e *P. stratiotes* e, as taxas de riqueza e diversidade da comunidade de macroinvertebrados associados às macrófitas. Em conclusão, a presença de ambos os agrotóxicos, isolados e em mistura, afetam o crescimento, biomassa e desenvolvimento das macrófitas, bem como a riqueza e diversidade da comunidade de macroinvertebrados.

**Palavras-chaves:** Cana-de-açúcar, agrotóxicos, formulações comerciais, macroinvertebrados, mesocosmos.

## ABSTRACT

YOSHII, M. P. C. **Effects of the herbicide 2,4-D and the insecticide fipronil, alone and in the mixture, on aquatic macrophytes and their associated fauna.** Ph.D. thesis in Environmental Engineering Sciences – PPG-SEA/EESC-USP, 2022.

Brazil is the world's largest producer of sugarcane and ethanol. This production, however, requires the use of several inputs for the scale production of these monocultures, highlighting the herbicide 2,4-D and the insecticide fipronil as the most used pesticides in this crop, which, like other pesticides, can directly compromise and indirectly human health and the environment. The present thesis evaluated, in laboratory and in field studies (mesocosms), the effects of the herbicide 2,4-D and the insecticide fipronil (commercial formulations: 2,4-D: DMA® 806 BR (Dow AgroSciences Industrial Ltda., Brasil) and fipronil: Regent® 800 WG (BASF S.A), isolated and in mixtures, on the aquatic macrophytes *Eichhornia crassipes*, *Glyceria maxima*, *Landoltia punctata*, *Myriophyllum aquaticum*, *Myriophyllum spicatum* and *Pistia stratiotes*. The results showed that the concentrations reported by Companhia Ambiental from the State of São Paulo (CETESB) in 2018 of 2,4-D (366 µg/L) and fipronil (465 µg/L) affect the macrophytes *L. punctata* and *M. aquaticum*, inhibiting growth by up to 44% and biomass in 68% compared to control. Macrophytes *G. maxima* and *M. spicatum* (from temperate region) when exposed to 2,4-D, decline in biomass and growth are observed. However, the combination of tested environmentally real concentrations of fipronil and 2,4-D in mesocosms affect the growth of the stem and roots of the macrophytes *E. crassipes* and *P. stratiotes* and, the rates of richness and diversity of the macroinvertebrate community associated with the macrophytes. In conclusion, the presence of both pesticides, alone and in mixture, affects the growth, biomass and development of macrophytes, as well as the richness and diversity of the macroinvertebrate community.

**Key-words:** sugarcane, pesticides, commercial formulation, macroinvertebrates, mesocosms.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática das metodologias usadas nos estudos ecotoxicológicos.	27
<b>Figura 2:</b> <i>Landoltia Punctata</i> .....	32
<b>Figure 3:</b> <i>Myriophyllum Aquaticum</i> .....	33
<b>Figura 4:</b> <i>Pistia Stratiotes</i> .....	34
<b>Figure 5:</b> <i>Eichhornia Crassipes</i> .....	34
<b>Figura 6:</b> <i>Glyceria Maxima</i> .....	35
<b>Figura 7:</b> <i>Myriophyllum Spicatum</i> .....	36
<b>Figura 8:</b> Esquema das etapas desenvolvidas durante a pesquisa.....	44
<b>Figura 9:</b> Esquema de distribuição dos tratamentos e as dimensões dos mesocosmos.....	51
<b>Figura 10:</b> Culturas de <i>E. Crassipes</i> estabelecidas nos mesocosmos e demonstração de como a macrófita <i>E. crassipes</i> foi dividida entre caule e raízes.....	52
<b>Figura 11:</b> Preparação e distribuição das macrófitas <i>P. Stratiotes</i> .....	53
<b>Figura 12:</b> Representação das dimensões dos mesocosmos e da área de estudo.....	56
<b>Figura 13:</b> Etapas de instação dos microcosmos. 1: limpeza dos microcosmos; 2: microcosmos limpos e cheios de água; 3: macroinvertebrados adicionados aos microcosmos; 4: armadilha utilizada para os macroinvertebrados; 5: microcosmos finalizados e, 6: distribuição das plantas nos microcosmos.....	58
<b>Figura 14:</b> Alterações no número de frondes e biomassa fresca (a) e na inibição da taxa crescimento (b) da espécie <i>L. punctata</i> após exposição ao 2,4-d e fipronil, isolados e em mistura.....	63
<b>Figura 15:</b> Respostas de crescimento e inibição de crescimento da macrófita <i>M. aquaticum</i> após exposição ao 2,4-d e fipronil, isolados e em mistura.....	64
<b>Figura 16:</b> Biomassa fresca da macrófita <i>M. aquaticum</i> após exposição ao 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.....	65
<b>Figura 17:</b> Valores de clorofila a, b total e carotenoide ( $\mu\text{g/L}$ ) para <i>L. Punctata</i> (A) e <i>M. aquaticum</i> (B) após exposição ao 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.....	65
<b>Figura 18:</b> valores de comprimento do caule (cm), raízes (cm) e biomassa fresca (g) obtidos para a espécie <i>E. crassipes</i> após exposição aos tratamentos C (controle), D (2,4-d), F (fipronil), M (mistura de 2,4-D e fipronil), V (vinhaça) e MV (mistura de vinhaça, 2,4-d e fipronil) em diferentes períodos de amostragem.....	69
<b>Figura 19:</b> Efeito da adição da mistura da vinhaça com fipronil e 2,4-D na sobrevivência das macrófitas aquáticas no tratamento mv nos tempos $t_0$ (antes da adição) e $t_2$ (após adição). .....	70
<b>Figura 20:</b> Efeitos da adição da vinhaça (V) e da mistura de vinhaça com os agrotóxicos (MV) na sobrevivência e crescimento das macrófitas após 7 dias de contaminação.....	73
<b>Figura 21:</b> Valores de comprimento do caule (cm), raízes (cm) e biomassa fresca (g) obtidos para a espécie <i>pistia stratiotes</i> após exposição aos tratamentos C (controle), D (2,4-D), F (fipronil), M (mistura de 2,4-D e fipronil), v (vinhaça) e mv (mistura de vinhaça, 2,4-D e fipronil) em diferentes períodos de amostragem ( $t_1$ , $t_2$ e $t_3$ ).....	75
<b>Figura 22:</b> Valores de n total, P total e C total quantificados em <i>P. stratiotes</i> (a) e em <i>E. crassipes</i> (b) nos diferentes tratamentos e períodos de amostragem.....	77
<b>Figura 23:</b> Valores de riqueza e diversidade de espécies (bits/ind.) obtidos para a fauna associada de macroinvertebrados nas macrófitas <i>P. stratiotes</i> (a) e I (b), nos diferentes tratamentos e período de amostragem.....	85
<b>Figura 24:</b> Análise PRC para a comunidade de macroinvertebrados associados às macrófitas considerando os diferentes tratamentos e períodos de coleta para <i>P.stratiotes</i> (A) e <i>E. crassipes</i> (B).....	86

<b>Figura 25:</b> Resumo esquemático das hipóteses de feitos diretos e indiretos causados pela exposição ao herbicida 2,4-D, inseticida fipronil e vinhaça, isolados e em mistura sobre as macrófitas <i>E. crassipes</i> e <i>P. stratiotes</i> , fauna de macroinvertebrados e qualidade da água.	95
<b>Figura 26:</b> <i>Endpoints</i> avaliados para a espécie <i>G. maxima</i> mediante exposição às diferentes concentrações do herbicida 2,4-d após 14 e 28 dias da adição do contaminante.....	99
<b>Figura 27:</b> <i>Endpoints</i> avaliados para a espécie <i>M. spicatum</i> mediante exposição às diferentes concentrações do herbicida 2,4-d após 14 e 28 dias da adição do contaminante.....	101
<b>Figura 28:</b> Composição, Densidade e índices ecológicos obtidos para a comunidade zooplânctonica presente nos diferentes tratamentos com 2,4-D.....	102
<b>Figura 29:</b> Resumo esquemático das hipóteses de feitos diretos e indiretos causados pela exposição ao herbicida 2,4-d sobre as macrófitas <i>M. spicatum</i> e <i>G. maxima</i> , fauna de macroinvertebrados e zooplâncton e qualidade da água. ....	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Concentrações de 2,4-D e fipronil (isoladas e misturas) testadas nos bioensaios laboratoriais de <i>L. punctata</i> e <i>M. aquaticum</i> .....	47
<b>Tabela 2:</b> Valores de EC <sub>50</sub> , EC <sub>20</sub> e EC <sub>10</sub> do 2,4-D calculados para a espécie <i>L. punctata</i> exposta ao herbicida 2,4-D.....	62
<b>Tabela 3:</b> Composição, densidade e grupo alimentar de macroinvertebrados presentes nas raízes de <i>P. stratiotes</i> durante período experimental nos tratamentos Controle (C), 2,4-D (D), Fipronil (F) e M (mistura de 2,4-D e fipronil) nos tempos <i>t1</i> , <i>t2</i> e <i>t3</i> .....	79
<b>Tabela 4:</b> Composição, densidade e grupo alimentar de macroinvertebrados presentes nas raízes de <i>E. crassipes</i> durante período experimental nos tratamentos Controle (C), 2,4-D (D), Fipronil (F), M (mistura de 2,4-D e fipronil), V (vinhaça) e MV (mistura) nos tempos <i>t0</i> , <i>t1</i> , <i>t2</i> e <i>t3</i> .....	80
<b>Tabela 5:</b> Composição, densidade e grupo alimentar de macroinvertebrados presentes nas raízes de <i>E. crassipes</i> durante período experimental nos tratamentos Controle (C), 2,4-D (D), Fipronil (F), M (mistura de 2,4-D e fipronil), V (vinhaça) e MV (mistura) nos tempos <i>t0</i> , <i>t1</i> , <i>t2</i> e <i>t3</i> (Continua).....	82
<b>Tabela 6:</b> Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos quantificados nos mesocosmos durante o experimento.....	89
<b>Tabela 7:</b> Caracterização físico-química da vinhaça realizada por Pinto et al., (2021b).....	93
<b>Tabela 8:</b> Valores quantificados dos agrotóxicos, 2,4-D e fipronil, nos tratamentos C, D, F, M, V e MV 2 horas, 7, 30 e 75 após a contaminação.....	94
<b>Tabela 9:</b> Valores de CE <sub>10</sub> ; CE <sub>20</sub> e CE <sub>50</sub> calculados para a <i>M. spicatum</i> nos dias 14 e 28 após a contaminação com 2,4-D.....	100
<b>Tabela 10:</b> Valores de 2,4-D quantificados nos microcosmos durante o experimento (µg a.i. L).....	103

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1 O cenário da produção de cana-de-açúcar e etanol .....	17
2.2 O uso de agrotóxicos no cultivo de cana-de-açúcar .....	18
2.3 O uso da vinhaça no cultivo de cana-de-açúcar .....	22
2.4 Efeitos dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos .....	23
2.5 Testes ecotoxicológicos como ferramenta de diagnóstico ambiental .....	25
2.6 Estudos ecotoxicológicos em modelos ecossistêmicos .....	26
2.7 Macrófitas aquáticas como organismos testes .....	29
2.8 Comunidade de macroinvertebrados associada à macrófitas aquáticas ...	36
2.9 Serviços ecossistêmicos prestados pelas macrófitas aquáticas .....	38
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	40
<b>4. HIPÓTESES</b> .....	42
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	43
5.1 Geral:.....	43
5.2 Específicos: .....	43
<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
6.1 Delineamento experimental.....	44
6.2 Contaminantes.....	45
6.3 Etapa 1: Experimentos em laboratório .....	45
6.4 Etapa 2: Experimentos em modelos ecossistêmicos – clima tropical .....	50
6.5 Etapa 3: Experimentos em modelos ecossistêmicos – clima temperado ....	56
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	62
7.1 Experimentos laboratoriais .....	62
7.2 Modelos ecossistêmicos em clima tropical (Itirapina, Brasil) .....	67
7.3 Modelos ecossistêmicos em clima temperado (Renkun, Países Baixos) ....	97
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	106
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	109
Apêndice.....	110

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo que mais da metade de toda a produção é destinada ao setor sucroenergético para o processamento em etanol, que, em termos de biocombustível, se apresenta como o melhor custo-benefício em esfera econômica e sustentável. O estado de São Paulo responde por 62% da produção nacional, com a maior área destinada a esse cultivo e a produção de etanol (ANDRADE; ROMEIRO, 2009; GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008; INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2017).

Na cultura de cana-de-açúcar faz-se necessário o emprego de tecnologias que inclui maquinários, *software* de monitoramento remoto, melhoramentos genéticos e insumos para proteger e melhorar a cultura, o que inclui os agrotóxicos (PIGNATI et al., 2014; VIEIRA; ROSENDO, 2015).

O uso dos agrotóxicos favorece o cultivo e garante bons resultados na produção agrícola, no entanto, também é responsável por inúmeros impactos ao meio ambiente e à saúde humana (ARBEX et al., 2007; BELCHIOR et al., 2017; CHRISTOFOLETTI et al., 2017; PELAEZ et al., 2015; SPADOTTO, 2006b).

Entre estes impactos, destacam-se os efeitos negativos nos ecossistemas aquáticos, incluindo a poluição, resultando em desequilíbrio ecológico, perda de diferentes espécies e alteração na cadeia trófica, verificando-se que estas, em sua maioria, não representam os organismos alvos das aplicações dos agrotóxicos (AMÉRICO et al., 2015; ARBEX et al., 2007; BERTI; DÜSMAN; SOARES, 2009; SILVA; CAMPOS; BOHM, 2013; SPADOTTO, 2006a).

Relevante ressaltar a importância dos serviços ambientais que os ecossistemas aquáticos provêm, que vão desde o fornecimento de água e alimento até as funções de produção primária, decomposição de matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e manutenção das interações ecológicas, e como estes serviços podem ser afetados com a presença de contaminantes, como os agrotóxicos (HECTOR; BAGCHI, 2007; ISBELL et al., 2011; NAEEM; DUFFY; ZAVALTA, 2012; SANCHES et al., 2016).

Para a avaliação dos efeitos dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos e terrestres, a Ecotoxicologia apresenta-se como ferramenta de estudo essencial. Por meio desta ciência avalia-se a ação de agentes químicos tóxicos no meio (COSTA et al., 2008; RELYEA, 2009; RELYEA; HOVERMAN, 2006; ZAGATTO, 2008), auxiliando na determinação dos impactos causados por esses contaminantes nas comunidades aquáticas,

bem como dos limites permitidos dessas substâncias no ecossistema (ARAÚJO et al., 2006). Para tanto, ensaios de toxicidade agudos e crônicos são realizados com espécies de diferentes níveis tróficos com significativa representação ecológica (PAIVA MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008), incluindo entre elas, as macrófitas aquáticas (SCHNEIDER, 2014). Entre as principais características das macrófitas aquáticas destacam-se os serviços prestados aos ecossistemas como produtora primária, ciclagem e estocagem de nutrientes, bem como o fornecimento de abrigo e alimento para a fauna diversificada (ESTEVES, 1998; MARTINS; PITELLI, 2005a; POTT; POTT, 2000). Por suas variadas interações ecológicas, os estudos com as macrófitas aquáticas vêm despertando interesse cada vez maior na Ecotoxicologia aquática (CESCHIN; BELLINI; SCALICI, 2021; MAGALHÃES et al., 2016).

Exposto aqui brevemente a importância do cultivo da cana-de-açúcar para a produção do etanol, o uso de insumos nesses cultivos, bem como das macrófitas aquáticas e suas interações com o meio e seus serviços prestados ao ecossistema, fica evidente a necessidade de um estudo que abranja todos esses aspectos. Diante disso, o presente trabalho traz como objetivo identificar e avaliar os efeitos da utilização de formulações comerciais do herbicida 2,4-D e o inseticida fipronil (isolados e em mistura) em macrófitas aquáticas e em suas interações com fauna associada, por meio de experimentos laboratoriais e *in situ*, considerando as áreas de cultivo de cana-de-açúcar. A partir dos resultados obtidos, espera-se evidenciar as ações desses contaminantes em alguns parâmetros biológicos das macrófitas aquáticas (como mortalidade, desenvolvimento, bioacumulação e biomassa, entre outros), seus consequentes impactos na fauna associada e na estrutura e funcionamento dos ecossistemas aquáticos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O cenário da produção de cana-de-açúcar e etanol**

No ano de 1968, em decorrência dos sérios problemas ambientais que afetavam o mundo e as evidências de mudanças no clima que foram detectadas em meados do século XX, favorecidas pelo número crescente de estações meteorológicas e pelos dados de satélites (OLIVEIRA; SANTOS; SILVA, 2016), a primeira Conferência Internacional das Nações Unidas sobre o Ambiente Humano foi convocada. O evento ocorreu em junho de 1972 na cidade de Estocolmo, com o objetivo de discutir as perspectivas dos países desenvolvidos frente aos países em desenvolvimento, bem como os impactos provenientes de suas atividades e ações mitigatórias a serem adotadas (SANTOS, 2012).

Desde essa época, o assunto “mudanças climáticas” ganhou notoriedade em inúmeras discussões e acordos firmados entre diversos países por intermédio das vinte e duas Conferências das Nações Unidas sobre as Mudanças Climáticas (COP/ONU). Essas reuniões contribuíram para a elaboração de políticas públicas, como o Plano Nacional sobre Mudança do Clima, que teve como objetivo incentivar o desenvolvimento e aprimoramento de ações de mitigação, colaborando com o esforço mundial na redução das emissões de gases de efeito estufa (BRASIL, 2008) e em investigações científicas, dentre outras ações. Assim, esforços mundiais empenhados no desenvolvimento de fontes alternativas e sustentáveis de energia cresceram simultaneamente com o avanço das mudanças climáticas globais (BUCKERIDGE et al., 2012; GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008).

Em relação aos combustíveis renováveis, destacam-se as obtenções de energia de biomassa e em especial o etanol, originário da cana-de-açúcar, mandioca, milho, batata-doce, babaçu, beterraba e sorgo (ANDRADE; ROMEIRO, 2009; GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008).

Embora o etanol possa ser obtido a partir de diferentes fontes alternativas, como mencionado anteriormente, a cana-de-açúcar é a matéria-prima com maior importância na produção alcooleira nacional. Isso se dá devido a existência de uma estrutura agroindustrial desenvolvida, adaptação da cana-de-açúcar às condições climáticas do país, além do fato de ser considerada o melhor custo/efetividade para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa (ANDRADE; ROMEIRO, 2009; GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008). Comparado com a gasolina, o etanol diminui em

média 89% a emissão de gases como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) e óxido nitroso (NO<sub>2</sub>) (CAVALETT et al., 2013).

Em termos de produção de etanol de cana-de-açúcar, o Brasil é o maior produtor no mundo, seguido pela Índia e China (IEA, 2021). A região sudeste do país é responsável por mais de 62% de toda a produção de cana-de-açúcar (IBGE, 2017) e somente o Estado de São Paulo responde por 52% dessa produção, sendo o primeiro em área de cultivo, ultrapassando 5 milhões de hectares de área plantada e uma produção na ordem de 380 milhões de toneladas no ano de 2016 (IBGE, 2017).

Além da produção, o Estado de São Paulo é considerado o berço do desenvolvimento tecnológico e da indústria de base, onde estão alocados os principais institutos e pesquisas relacionados à produção de cana-de-açúcar, destacando o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), a Pesquisa em Bioenergia (Bioen), o Parque Tecnológico de Piracicaba, a plataforma de Monitoramento da Cana-de-açúcar (CANASAT) e o Núcleo de Apoio à Pesquisa em Bioenergia e Sustentabilidade (NAPBS).

## **2.2 O uso de agrotóxicos no cultivo de cana-de-açúcar**

Por ser um cultivo intensivo, a cultura de cana-de-açúcar é adepta do uso de insumos e da adoção de tecnologias para o aumento da produtividade e redução nos prazos da produção (PIGNATI et al., 2014; VIEIRA; ROSENDO, 2015), sendo exemplo desses insumos os agrotóxicos, que são produtos químicos, físicos ou biológicos usados no controle de pragas e ervas daninhas consideradas nocivas ao homem e que podem vir a interferir na produtividade de culturas. São também conhecidos por pesticidas, praguicidas ou produtos fitossanitários (SCHIESARI, 2012).

Segundo o IBAMA (2016), no ano de 2014 o Brasil consumiu mais de 541,8 mil toneladas de ingrediente ativo mil toneladas de agrotóxicos, e continua a ocupar o topo no ranking de consumo mundial (MATIAS, 2021). De acordo com os dados divulgados pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG) mais de 65% desses agrotóxicos foram aplicados nos cultivos de soja, cana-de-açúcar, milho safrinha, algodão e pastagem.

Os agrotóxicos são comercializados na forma de formulações que incluem um ou mais ingredientes ativos, que é a substância responsável pelo combate aos organismos-

alvo, e os ingredientes inertes, que tem a função de diluir o ingrediente ativo e facilitar sua dispersão ou penetração no organismo-alvo (OLIVEIRA, 2017; RODRIGUES, 2012; SCHIESARI, 2012).

De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), atualizado em 2020, no Brasil estão registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento cerca de 112 ingredientes ativos que compõem os 1.808 produtos formulados, classificados quanto à periculosidade ambiental em quatro categorias: Classe I: produtos impeditivos de obtenção de registro, produtos altamente perigosos ao meio ambiente; Classe II: produtos muito perigosos ao meio ambiente; Classe III: produtos perigosos ao meio ambiente; e, Classe IV: produtos pouco perigosos ao meio ambiente (WHO, 1990; OPS/WHO, 1996 apud PERES et al., 2003, YAMASHITA & SANTOS, 2009). Dentre os ingredientes ativos os mais comercializados no país são os herbicidas glifosato, seguido pelo 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) e atrazina (MATIAS, 2021).

Segundo dados do Instituto de Economia Agrícola – IEA (2020), os ingredientes ativos mais empregados no cultivo de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, entre os anos de 2009 e 2019, são os herbicidas 2,4-D, clomazona, ametrina, hexazinona+diuron, msma, e etefom e o inseticida fipronil. Diante o exposto, neste projeto em específico serão avaliados os efeitos decorrentes do uso do herbicida 2,4 D e do inseticida fipronil.

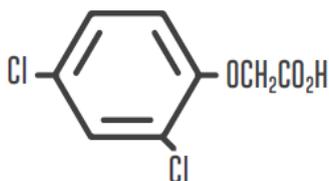
### **2.2.1 Herbicida 2,4-D**

O herbicida 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) pertence ao grupo químico do ácido ariloxialcanóico e é utilizado no controle de dicotiledôneas, apresentando baixos níveis de intoxicação à cultura, sendo que seu mecanismo de ação provoca alterações metabólicas e bioquímicas que levam a morte das plantas (FOLONI, 2016; PETERSON et al., 2016). O herbicida 2,4-D está entre os herbicidas orgânicos seletivos e sistêmicos de pós-emergência mais bem-sucedidos utilizados na agricultura, principalmente em culturas de trigo, sorgo, milho, arroz, cana-de-açúcar e soja (MIČIĆ; BIHARI; MLINARIČ-RAŠČAN, 2004; SONG, 2014). Portanto, o 2,4-D tornou-se indispensável no manejo de plantas daninhas em culturas de cana-de-açúcar (CHRISTOFOLETTI et al., 2017; REIS et al., 2008).

Pioneiro entre todos os defensivos agrícolas orgânicos, o 2,4-D é o principal representante do grupo dos herbicidas fenóxi e, há mais de 50 anos, é líder mundial no controle de plantas daninhas (PETERSON et al., 2016). É também o produto mais

estudado quanto à sua eficiência agrônômica e seus efeitos sobre a saúde humana e o meio ambiente (FOLONI, 2016).

- I. Grupo químico: ácidos fenoxiacéticos.
- II. Ingrediente ativo ou nome comum: 2,4-D.
- III. Nome químico: ácido 2,4-diclorofenoxiacético:
  - ✓ *Ácido*: pela forma ácida da molécula;
  - ✓ *2,4*: indica que há um átomo de cloro na posição 2 e outro na posição 4 do anel de fenol;
  - ✓ *Dicloro*: indica dois átomos de cloro;
  - ✓ *Fen*: indica o anel fenólico;
  - ✓ *Oxi*: indica o átomo de oxigênio na posição do anel de fenol;
  - ✓ *Acético*: indica o tipo de ácido.
- IV. Fórmula estrutural: 2,4-D ácido.



- V. Densidade: 1,42 g/mL a 25 °C.
- VI. Pressão de vapor 30 °C: Éster:  $3,0 \times 10^{-4}$  mm Hg; Amina:  $5,5 \times 10^{-7}$  mm Hg.
- VII. Solubilidade em água: 600 mg/L a 25 °C.
- VIII. Categoria química: não iônica com sorção muito baixa.
- IX. Coeficiente de partição n-octanol/água ( $K_{wo}$ ): Baixa

Os valores de  $K_{ow}$  apresentam correlação inversa com a solubilidade em água, e direta com a persistência do produto no ambiente ( $> K_{ow} > \text{sorção} > \text{persistência}$ ). Portanto, quanto maior a solubilidade em água do herbicida, menor tende a ser o  $K_{ow}$  e a sorção. Por outro lado, quanto menor o  $K_{ow}$ , maior o potencial de lixiviação do herbicida, o que pode resultar em menor efeito residual no solo (FOLONI, 2016).

- X. Constante de ionização (pKa): 2,8.

Quanto menor a constante pKa de uma substância, maior e mais rápida será sua dissociação em água, na faixa de pH existente nas águas naturais no Brasil, sendo que seu ponto de máxima dissociação ocorre quando  $pKa = pH$ . Já em solos, o pH influencia no

processo de retenção e degradação dos herbicidas. Estando estritamente relacionada à capacidade de dissociação eletrolítica (pKa) dos compostos (FOLONI, 2016).

### **Estudos sobre o comportamento ambiental do 2, 4-D**

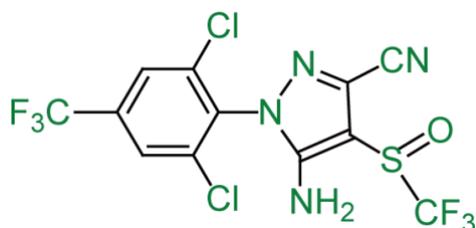
Aly e Faust (1964) investigaram alguns fatores físicos, químicos e biológicos que podem influenciar a persistência de compostos à base de 2,4-D em águas naturais. As solubilidades de sais de cálcio e magnésio de 2,4-D em água destilada a 25 °C foram determinadas como 4.000 mg/L e 11.100 mg/L, respectivamente. Concentrações normais de íons, cálcio e magnésio podem não remover 2,4-D por meio de reações de precipitação. O 2,4-D persistiu por até 120 dias em águas de lagos naturais aerobiamente incubados em laboratório. Ésteres de 2,4-D foram hidrolisados biologicamente para ácidos livres de álcool correspondente dentro de nove dias, de acordo com medições mediante técnicas manométricas.

Guimarães (2003) conduziu um trabalho visando a avaliar os efeitos do controle das macrófitas aquáticas por congelamento ou por 2,4-D sobre algumas características da água de mesocosmos, em comparação com situações de mesocosmos sem macrófitas e totalmente colonizados. As macrófitas flutuantes-livres utilizadas foram *Eichhornia crassipes* (aguapé), *Pistia stratiotes* (alface d'água) e *Salvinia auriculata* (orelha de onça). Os resultados encontrados demonstraram que a aplicação do 2,4-D (dose de 5,360 kg/ha de equivalente ácido), para o controle das macrófitas, não afetou expressivamente qualquer dos parâmetros considerados. Não foi alterada a concentração de clorofila e os resíduos encontrados após 60 dias estavam abaixo dos valores determinados pelas regulamentações no Brasil, indicando rápida dissipação do 2,4-D no ambiente aquático.

#### **2.2.2 Inseticida fipronil**

Fipronil (5-amino-1-(2,6-dicloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolil)-4-trifluorometil sulfinilpirazole-3-carbonitrila) é um inseticida e cupinicida de ação de contato e ingestão, pertencente ao grupo químico pirazol, utilizado em ampla escala devido à sua eficácia no controle de insetos daninhos em culturas, os quais são, em alguns casos, resistentes a outros pesticidas (BOBÉ; COSTE; COOPER, 1997; MANRIQUE; FIGUEIREDO; NETO, 2013). Fipronil age bloqueando os canais de cloro das células, danificando o sistema nervoso central do inseto (TINGLE et al., 2000).

- I. Grupo químico: Fenil pirazol
- II. Ingrediente ativo ou nome comum: Fipronil
- III. Nome químico: 5-amino-1- [2,6-dicloro-4- (trifluorometil) fenil] -4 - [(1R, S) - (trifluorometil) sulfinil] -1Hpirazole-3- carbonitrilo.
- IV. Fórmula molecular:  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$
- V. Fórmula estrutural:



- VI. Densidade: 1.62 g/mL a 20 °C.
- VII. Pressão de vapor - 25 °C:  $2.8 \times 10^{-9}$  mm Hg.
- VIII. Solubilidade em água: 0.0024 g/L (pH 5); 0.0022 g/L (pH 9).
- IX. Coeficiente de partição n-octanol/água ( $K_{wo}$ ): 4.01 (pH: 5.9 a 6.1) a 23°C.

No plantio da cana-de-açúcar existe a necessidade em proteger a cultura contra pragas e doenças do solo para garantir a produtividade, demandando o uso de produtos fitossanitários (VITTI; MAZZA, 2002; SILVA et al., 2012; FERREIRA, 2013). No entanto, o frequente e incorreto uso está associado à contaminação da atmosfera, dos solos, das águas superficiais e subterrâneas e dos alimentos, afetando negativamente organismos terrestres e aquáticos, ocasionando, também, a intoxicação humana ocupacional por trabalhadores e produtores rurais ou pelo consumo de água ou alimentos contaminados (BELCHIOR et al., 2017; CHRISTOFOLETTI et al., 2017; SPADOTTO, 2006b).

### 2.3 O uso da vinhaça no cultivo de cana-de-açúcar

A vinhaça da cana-de-açúcar é um subproduto do etanol amplamente utilizado como fertirrigação de lavouras devido às altas concentrações de potássio, cálcio, magnésio, sólidos orgânicos e minerais (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; MARTINELLI; FILOSO, 2008). A vinhaça, ou vinhoto, é um líquido de odor forte e

característico, de cor marrom-escura, apresenta pH baixo, alto teor de potássio e alta demanda química de oxigênio (DBO) (SILVA; BONO; PEREIRA, 2014).

O uso da vinhaça no manejo dos cultivos de cana-de-açúcar apresenta desde benefícios ambientais reduzindo o impactos ambientais com a disposição correta do resíduo, fornecendo água e nutrientes para o desenvolvimento da cultura e maior produção, à econômicos reduzindo o custo com fertilizantes minerais (JARAMILLO; RESTREPO, 2017; SOLTANGHEISI et al., 2019; TESSARO; SAMPAIO; CASTALDELLI, 2016; YIN et al., 2018). Por outro lado, sua aplicação vem ganhando espaços nas discussões acerca das implicações do uso como fertilizantes, devido ao seu alto poder poluente e os inúmeros malefícios que pode gerar quando em contato com a flora, fauna e macrofauna (BEBÉ et al., 2009; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011).

Estudos ecotoxicológicos vem sendo desenvolvidos afim de embasar as discussões sobre a melhor de maneira de se empregar essa prática de forma que organismos não-alvos, como a fauna edáfica e o ecossistema aquático não sejam afetados. Garcia (2018) analisou o potencial tóxico na vinhaça em *Rhinocricus padbergi* (Diplópode) onde na presença da vinhaça, apresentaram perda de limite celular e degradação citoplasmática. Moreira-de-Sousa (2018) avaliou os impactos gerados pela vinhaça em três espécies representantes da fauna edáfica, *Essência andrei*, *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida*, sendo a *Essência andrei* a espécie mais sensível sendo afetada no comportamento de fuga e reprodução.

Silva et al., (2021) demonstra que a presença da vinhaça afeta a sobrevivência do cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*. Pinto et al., (2021) demonstrou efeitos em sobrevivência, desenvolvimento e reprodução no antípoda *Hyaella meinerti* quando exposta a vinhaça e por fim, Silva et al., (2015) avaliou os efeitos na vinhaça na macrófita aquática *Lemna minor* e do peixe matogrosso (*Hyphessobrycon eques*) onde nas menores concentrações de vinhaça, 0.5% foram letalmente tóxicas aos indivíduos.

## **2.4 Efeitos dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos**

Os agrotóxicos utilizados no cultivo da cana-de-açúcar, como os herbicidas, fungicidas e inseticidas, representam 56% do volume total comercializado no país (MATIAS, 2021). Mesmo com os benefícios oriundos da utilização desses insumos, a

contaminação de corpos d'água, atmosfera, solos e alimentos vêm gerando preocupações para as autoridades e à população (RISSATO et al., 2006). A contaminação dos ecossistemas aquáticos e terrestres pode ocorrer durante e/ou após a aplicação desses produtos pelos processos de retenção (adsorção, absorção e sorção), transformação (degradação biótica e abiótica), transporte (deriva, lixiviação e carreamento superficial) e por interações desses processos (AMÉRICO et al., 2015; SILVA; CAMPOS; BOHM, 2013; SPADOTTO, 2006a).

Uma prática comumente utilizada pelos produtores é a mistura de agrotóxicos em tanque aplicador antes da aplicação, que tem como finalidade propiciar a redução de custos, do número de entradas na área, de combustível e do volume de água, menor compactação do solo, menor tempo de exposição do trabalhador rural ao agrotóxico e melhor manejo e prevenção da resistência de pragas (GAZZIERO, 2015).

Embora muito utilizada, pouco são conhecidos os efeitos dessa prática no ambiente. Relyea & Hoverman (2006) trouxe uma extensa revisão acerca dos potenciais efeitos da mistura de agrotóxicos em água doce, levantando a discussão sobre os efeitos nas interações entre espécies e outros efeitos indiretos dessas misturas. Cedergreen (2014) discute a definição de sinergismos na combinação entre dois ou mais agrotóxicos e explica que as interações entre os contaminantes podem ocorrer dentro e fora do organismo.

Del Grande et al. (2003) explicam que os agrotóxicos podem sofrer processos de bioacumulação em diferentes níveis tróficos, acumulando-se na gordura dos peixes e no leite de vacas que utilizam rios e córregos contaminados, por exemplo. Além disso, esses produtos podem ainda atingir com a fauna e flora nas adjacências dos cultivos, especialmente os polinizadores, que entram em contato direto com as plantas (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Os corpos d'água presentes ou próximos às áreas de cultivo que utilizam agrotóxicos como prática de controle de pragas e ervas daninhas, vêm apresentando o comprometimento da qualidade de suas águas, superficiais ou subterrâneas, devido ao escoamento superficial (*runoff*) e/ou transporte aéreo (*spray-drift*) desses produtos (BORTOLOZO et al., 2016; ULRICH; DIETRICH; FOHRER, 2013). Resultados obtidos em alguns estudos têm demonstrado a presença de agrotóxicos em diversos sistemas ambientais (ALBUQUERQUE et al., 2016; CORBI et al., 2006), por exemplo, avaliando amostras de sedimentos de 11 córregos da região central do Estado de São Paulo (São Carlos, Araraquara, Ribeirão Bonito, Ibaté, Dourado e Américo Brasiliense), em áreas

com cultivo de cana-de-açúcar, pastagem e mata ciliar, identificaram a presença de 16 organoclorados. Os maiores valores e ocorrências foram observados nos córregos situados em áreas adjacentes ao cultivo de cana-de-açúcar, evidenciando o aporte de agrotóxicos e sua relação com atividade canavieira.

Os efeitos prejudiciais decorrentes da ação dos contaminantes em organismos aquáticos estendem-se pelos demais componentes dos ecossistemas, podendo acarretar em alterações nas características e dinâmicas das populações (reprodução, migração, restabelecimento e mortalidade), na estrutura e função das comunidades (alteração na diversidade de espécies, modificações na relação predador-presa) e na função do ecossistema, alterando os processos de respiração e fotossíntese e, no fluxo de nutrientes (AMÉRICO et al., 2015; BERTI; DÜSMAN; SOARES, 2009; COSTA et al., 2008). Mesmo em concentrações baixas, os agrotóxicos podem apresentar riscos para muitas espécies, podendo esses efeitos tóxicos serem transferidos para outros organismos da cadeia alimentar (BERTI; DÜSMAN; SOARES, 2009; ZAGATTO, 2008).

hese pesticides are hence likely to occur simultaneously in edge-of-field water bodies in this region and this pesticide mixture may have greater toxic effects to aquatic life in these ecosystems than the individual compounds.

## **2.5 Testes ecotoxicológicos como ferramenta de diagnóstico ambiental**

A Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos de substâncias sintéticas e naturais em biota e flora, aquáticos e terrestres, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais esses organismos vivem (COSTA et al., 2008; ZAGATTO, 2008). Por meio de testes ecotoxicológicos é possível prognosticar quanto e como a presença de contaminantes afetam a vida de espécies, suas interações, comunidades e até mesmo ecossistemas (RELYEA, 2009; RELYEA; HOVERMAN, 2006).

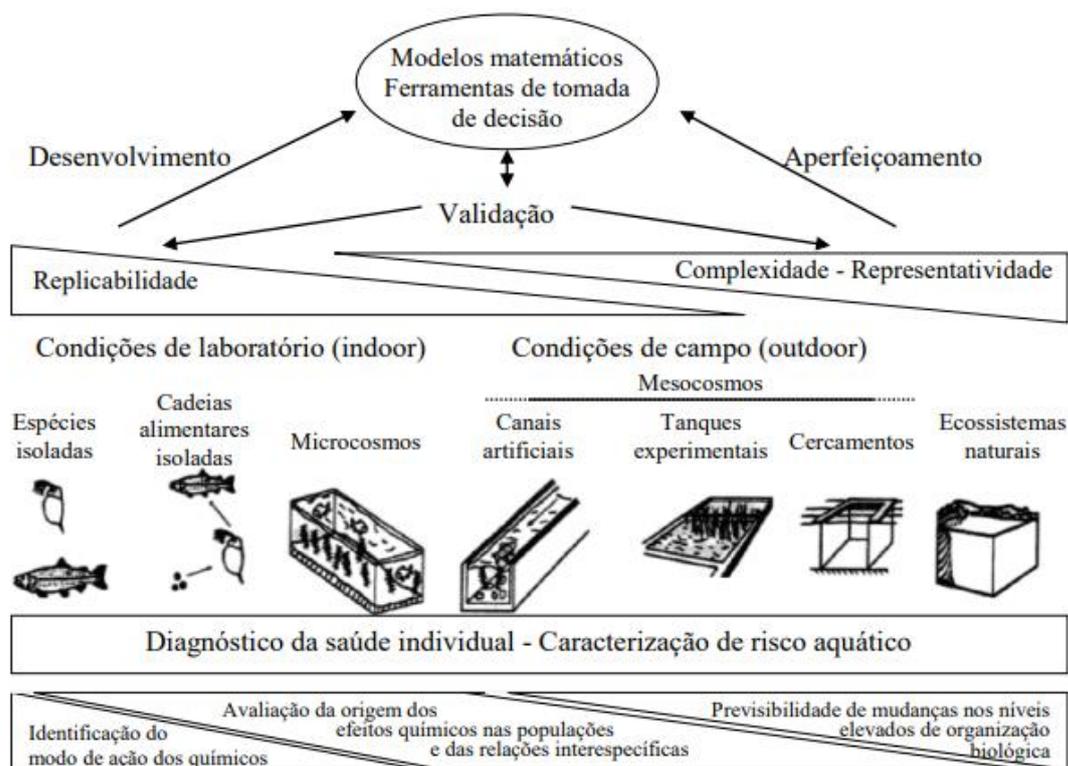
Para os estudos ecotoxicológicos sobre os efeitos dos agrotóxicos, utiliza-se organismos não-alvo, os quais apresentam maior sensibilidade nas matrizes ambientais e exercem importante papéis nesses sistemas. Na ecotoxicologia terrestre, por exemplo, as minhocas (ALVES et al., 2013; JORDAAN; REINECKE; REINECKE, 2012; NUNES;

ESPÍNDOLA, 2012) e colêmbolos (EL-TEMSAH; JONER, 2013; ZORTÉA et al., 2016) são utilizados pelo fato de ambos exercerem funções de decomposição da matéria orgânica através de seus hábitos alimentares e ciclagem de nutrientes (AQUINO, 2005). Em ecossistemas aquáticos, grande parte dos trabalhos é realizado com algas (LIU et al., 2013; SALMAN; ABDUL-ADEL; ALKAIM, 2016), cladóceros (NOVELLI et al., 2012; TOUMI et al., 2013) e peixes (ASSIS et al., 2012; BACCHETTA et al., 2014).

Do ponto de vista da proteção do ambiente natural, a avaliação ecotoxicológica aquática de novos pesticidas, e dos já existentes, assim como de espécies de outros grupos taxonômicos do que os referidos no parágrafo anterior (i.e. macrófitas e macroinvertebrados), torna-se cada vez mais importante. A justificativa de tais testes baseia-se no conceito de que, mesmo que usados de acordo com as boas práticas agrícolas, os agrotóxicos podem contaminar as águas superficiais por várias rotas, como derrame de pulverização, escoamento superficial e drenagem de campo (KATAGI, 2006, 2010). Relativamente aos outros grupos taxonômicos, as espécies padrão de algas, peixe e crustáceos podem apresentar sensibilidade inferior às espécies não-alvos. Por exemplo, o crustáceo *Daphnia magna* é 10.000 vezes menos sensível ao inseticida imidacloprido do que os crustáceos da classe Ostracoda (DAAM et al., 2013). Similarmente, as espécies de macrófita do gênero *Lemna* spp são significativamente menos sensíveis ao 2,4-D do que outras espécies de macrófitas (BELGERS et al., 2007).

## **2.6 Estudos ecotoxicológicos em modelos ecossistêmicos**

Os estudos ecotoxicológicos são baseados, em sua maioria, em bioensaios laboratoriais, sendo em geral monoespecíficos, ou em modelos ecossistêmicos, i.e. microcosmos, permitindo identificar efeitos decorrentes da exposição de um ou mais elementos estressores; e mesocosmos, ou seja, em estudos em campo controlados, onde são testadas variações das condições naturais e aplicações químicas em sistemas fechados; e em estudos de avaliação em campo ecológico, em que espécies naturais estão sujeitas ao contato com diversos contaminantes e agentes estressores (HOFFMAN et al., 2002; MENDES, 2015; ZAGATTO, 2008). A relevância e complexidade desses estudos são apresentadas abaixo (Figura 1).



**Figura 1:** Representação esquemática das metodologias usadas nos estudos ecotoxicológicos.  
 Fonte: Rezende, 2015, adaptado de Caquet et al., 2000.

De acordo com Odum (1984), os mesocosmos podem ser definidos como um ecossistema artificial de pequena escala mantido sob condições naturais, variando de tamanho entre 0,1 e 1000 m<sup>3</sup> (CAQUET; LAGADIC; SHEFFIELD, 2000; GRANNEY, 1993; LALLI, 1990). Para Crossland et al., (1992), os modelos ecossistêmicos são divididos em duas categorias, dependendo de seu tamanho e complexidade, microcosmos com volume de água inferior a 15m<sup>3</sup> e, mesocosmos contendo mais de 15m<sup>3</sup> de volume de água. Entretanto, o limite do volume de água não faz referência aos parâmetros ecológicos relevantes, como estabilidade e autos sustentabilidade, integrando os principais processos ecológicos e as simplificações substanciais da estrutura da comunidade (MENDES, 2015).

Conforme mencionado anteriormente, parte dos estudos ecotoxicológicos são realizados em laboratórios sob condições controladas, onde apenas uma espécie é avaliada, permitindo uma análise dos efeitos diretos dos contaminantes sobre determinada espécie (ARAÚJO et al., 2006), porém, são limitados na compreensão dos diversos processos decorrentes da contaminação, pois desconsideram a complexidade do ambiente (PABLO et al., 2008). Já os estudos em campo ou mesocosmos são capazes de estimar o destino do contaminante, avaliar os efeitos primários e diretos nos níveis de organização de indivíduo, população e comunidade, bem como os efeitos secundários e terciários indiretos nestes níveis (BERTOLETTI, 2001; DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; LAABS et al., 2007). Suas desvantagens relacionam-se ao alto custo, dificuldade na instalação e manutenção, bem como a baixa replicabilidade (MENDES, 2015).

Tomando como exemplos os diversos estudos realizados pelo Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA/CRHEA/EESC/USP) utilizando as estruturas de mesocosmos e microcosmos para avaliação dos efeitos de contaminantes em ecossistemas aquáticos, pode-se citar Novelli et al. (2012, 2016), que avaliaram os efeitos de Vertimec sobre a estrutura da comunidade planctônica, considerando *runoff* e *spray-drift*; Vasconcelos et al. (2016), que realizaram testes laboratoriais e experimentos em mesocosmos para avaliar os efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE, utilizando girinos da espécie *Lithobates catesbeianus* como organismo-teste; Sanches et al. (2017), que avaliaram a toxicidade da abamectina e do difenoconazol no zebrafish (*Danio rerio*) em microcosmos; Shinn et al. (2015) que analisaram os efeitos do fungicida pirimetanil no crescimento da microalga verde *Raphidocelis subcapitata* em mesocosmos; Moreira et al. (2017) que avaliaram a toxicidade do Kraft® 36 EC (a.i. abamectina), Score® 250 EC (a.i. difenoconazol) e sua mistura ao cladocera *Macrothrix flabelligera* em microcosmos, entre outros. Resultados de outros estudos podem ser encontrados nos trabalhos de Vanderlei (2015), Mendes (2015) e Sanchez (2016).

Vários estudos relatam a toxicidade do 2,4-D e do fipronil, isolados e em misturada, em organismos aquáticos, por exemplo: retardou a metamorfose e inibiu o crescimento de girinos (FREITAS et al., 2019), reduziu a reprodução do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* (SILVA et al., 2020), reduziu as taxas de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento do mosquito *Chironomus sancticaroli* (PINTO et al., 2021a), provocou alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas na microalga *Raphidocelis subcapitata* (MOREIRA et al., 2020), e gerou efeitos negativos em invertebrados terrestres e espécies de plantas não-alvo (TRIQUES et al., 2021).

## 2.7 Macrófitas aquáticas como organismos testes

Macrófitas aquáticas são definidas como vegetais visíveis a olho nu, com partes fotossinteticamente ativas, permanentemente, total ou parcialmente submersa em água doce ou salobra (COOK et al., 1974; THOMAZ; BINI; PAGIORO, 2004). São classificadas em sete grupos ecológicos, sendo eles: anfíbia, emergente, flutuante fixa, flutuante livre, submersa fixa, submersa livre e epífita (ESTEVEES, 1998; POTT; POTT, 2000). Entre suas principais características, destaca-se seu papel de produtora primária em conjunto com as microalgas, a participação na ciclagem e estocagem de nutrientes, formação de detritos orgânicos e controle da poluição e eutrofização artificial (BOYD, 1969; BROCK et al., 1983; ESTEVES, 1998; RIEMER; TOTH, 1969).

As macrófitas são responsáveis também por promover a diversificação de habitats, criando locais de abrigo e alimentação para fauna, substrato natural para a formação de perifíton, influenciando na sedimentação e retenção de nutrientes e nas características físicas e químicas da água (ESTEVEES, 1998; NEVES; FOLONI; PITELLI, 2002). Por essas características, Pompêo (2009) já afirmava que os estudos sobre macrófitas aquáticas ampliaria o conhecimento sobre inúmeros aspectos de sua ecologia e constituiria base para aplicação em projetos de manejo e monitoramento, por exemplo.

De acordo com a literatura consultada, os estudos utilizando macrófitas aquáticas como organismos testes vêm ganhando espaço na ecotoxicologia (CESCHIN; BELLINI; SCALICI, 2021; GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011). Por estarem presentes em diversos ecossistemas aquáticos e desempenhando diferentes funções ecológicas, além de sua alta biodiversidade e crescimento rápido, favorecem a realização de testes de hipóteses ecológicas e estudos ambientais, exercendo o papel de bioindicador em ambientes alterados por atividades humanas (BOVE et al., 2003; POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS, 2003; THOMAZ; BINI; PAGIORO, 2004).

Entre os trabalhos já realizados, podem ser citados aqueles que avaliaram a capacidade de bioacumulação de substâncias químicas pelas macrófitas (GILONI-LIMA, 2010; ODJEGBA; FASIDI, 2007; SINGH; RAI, 2016); biorremediação (ESCOTO, 2017; ODJEGBA; FASIDI, 2007); bioindicadores da qualidade da água em ambientes lacustres (SANTOS; BOINA, 2017) e arroios (HEGEL; MELO, 2016), habitat para o crescimento

da comunidade de algas perifíticas (FERREIRA DA SILVA et al., 2011; POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS, 2003), de macroinvertebrados (SAULINO; TRIVINHO-STRIXINO, 2014), peixes (SEGATTI HAHN; CRIPPA, 2006) e anfíbios (MOREIRA, 2009). Outros estudos demonstram o uso de diversas espécies de macrófitas para tratamento da água dos esgotos, como os desenvolvidos por Salati et al. (1982, 1987, 1999, 2009), com o uso das espécies *Eichornia crassipes*, *Lemna* sp., *Spirodella* sp. e *Wolffia* sp.

Outros estudos com as macrófitas aquáticas relacionam-se com os biomarcadores, os quais são definidos como alterações biológicas que expressam a exposição e/ou o efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente (WALKER et al., 2012). Os biomarcadores atuam como sistemas de aviso precoce, evitando assim que efeitos adversos irreversíveis ocorram, como mutações genéticas ou morte celular, atingindo populações ou ecossistemas (JONSSON et al., 2002; MCCARTHY; SHUGART, 1990). Existem biomarcadores moleculares, bioquímicos, celulares ou sistêmicos, e alguns deles são mais específicos para determinados poluentes, sendo que dentre os biomarcadores bioquímicos já utilizados em plantas estão a análise de pigmentos e taxa fotossintética. Blankenship (2014) afirma que sendo os pigmentos, como a clorofila, indispensáveis ao metabolismo das plantas, uma mudança em seus níveis poderia ser utilizada como biomarcador, sinalizando estresse na planta.

Huiyun et al. (2009), por exemplo, avaliando os efeitos dos herbicidas butacloro, quinclorac, bensulfurão-metilo e atrazina em seis concentrações (0,0001; 0,005; 0,05; 0,01; 0,5 e 1,0 mg/L), nas macrófitas aquáticas *Ceratophyllum demersum*, *Vallisneria natans* e *Elodea nuttallii*, observaram sintomas de toxicidade, como: clorose, inibição do crescimento, diminuição do peso fresco e da taxa de crescimento relativo, além da redução das concentrações de clorofila, sinalizando sintomas de estresse na planta. Os autores concluíram que a análise de pigmento e a taxa fotossintética possuem potencial para atuar como biomarcadores de contaminação por herbicidas em ambientes aquáticos.

Lytle e Lytle (1998) também desenvolveram estudos com biomarcadores. Os autores selecionaram duas espécies dominantes no lago Davis Bayou, em Mississippi – EUA (*Junco roemerianus* e *Spartina alterniflora*), as quais foram expostas (0,03, 0,25 e 3 mg atrazina/L) para avaliar a atividade da peroxidase (POD), a peroxidação lipídica, as alterações de clorofila e as taxas de crescimento. Após a exposição, não se verificou um aumento significativo na atividade de POD em *J. roemerianus*, mas houve perda significativa nas concentrações de clorofilas *a* e *b*, indicando que a espécie não

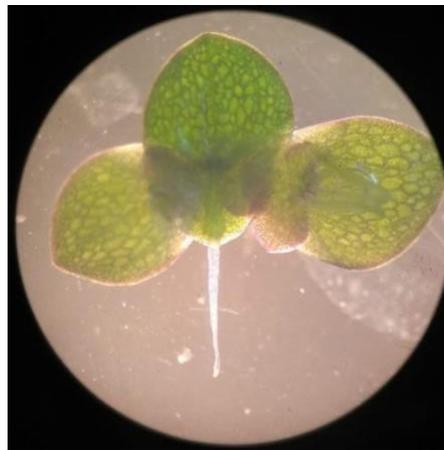
apresentava resistência à atrazina. Por outro lado, *S. alterniflora* mostrou pouco sintomas que indicassem estresse e teve alta atividade de POD (que hipoteticamente protegeu-a contra o estresse oxidativo) e não teve perda significativa na concentração de clorofila.

Em relação ao uso das macrófitas aquáticas como organismos-teste com agrotóxicos, podemos citar Burešová et al., (2013), que avaliou os efeitos do herbicida linuron sobre a espécie *Myriophyllum spicatum* durante 21 dias em laboratório, seguindo o protocolo de testes agudos e crônicos com macrófitas aquáticas da OECD (2004). Os balanços de massa obtidos mostraram uma rápida absorção do linuron pelas raízes de macrófitas, o que permitiu concluir que os caminhos conhecidos e as propriedades do composto sustentam a hipótese de que *Myriophyllum* absorve o linuron diretamente da água através das raízes e a concentração do contaminante pelos poros das raízes é o parâmetro mais relevante para descrever os efeitos sobre macrófitas. Vervliet-Scheebaum et al. (2010) avaliaram os efeitos do herbicida simazina em um sistema de microcosmos em campo com duas espécies submersas (*Myriophyllum spicatum* e *Elodea canadenses*) e duas espécies enraizadas emergentes (*Persicaria amphibia* e *Glyceria maxima*), durante um período de 84 dias. Neste estudo, o herbicida foi aplicado nos microcosmos em concentrações nominais de 0,05, 0,5 e 5 mg/L e os *endpoints* biológicos e fisiológicos foram utilizados para avaliar a toxicidade dos herbicidas em macrófitas e nas algas que se desenvolvem naturalmente no sistema. Os autores verificaram valores de concentração de efeito não observado (CENO) em concentrações de 0,05 mg de ingrediente ativo de simazina, após 84 dias. *E. canadensis* foi a espécie mais negativamente afetada considerando o fator crescimento, que foi consistentemente um parâmetro muito mais sensível para todas as macrófitas.

Considerando os estudos anteriores, e por sua distribuição geográfica, as espécies escolhidas para a realização desta pesquisa foram: *Landoltia punctata*, *Myriophyllum aquaticum*, *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Glyceria maxima* e *Myriophyllum spicatum*. A seleção foi realizada após o levantamento dos estudos já realizados com macrófitas aquáticas como biomarcadores, bioacumuladoras, por suas respostas morfológicas e fisiológicas após a exposição à contaminantes diversos, suas funções de abrigo e substrato para outras comunidades e, por sua disponibilidade nos bancos de cultivo de macrófitas aquáticas do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA/CRHEA/EESC/USP), considerando-se ainda a facilidade de serem coletadas e se adaptarem às condições experimentais.

### 2.6.1 *Landoltia punctata*

A espécie *Landoltia punctata*, comumente conhecida como lentilha-d'água (Figura 2), pertence à família Lemnaceae, sendo uma erva aquática flutuante livre, de 2 a 5 mm de comprimento, com duas ou mais raiz por fronde, propagação principalmente vegetativa e também por sementes. Uma espécie utilizada como despoluidora de água, alimento de patos, pequenos peixes, insetos e outros organismos aquáticos, preferindo água parada e levemente sombreada (POTT; POTT, 2000).



**Figura 2:** *Landoltia punctata*.  
Fonte: Autora, 2018

### 2.6.2 *Myriophyllum aquaticum*

A macrófita *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. (Figure 3), também conhecida como pinheirinho d'água, pena d'água e pena de papagaio, pertence à família Haloragaceae, nativa da América do Sul (ORCHARD, 1981). Pertence ao grupo das macrófitas submersas, podendo permanecer totalmente submersa ou emersa. A reprodução é possível a partir de pedaços de ramos de alguns milímetros de comprimento (KISSMANN, 1995).



**Figure 3:** *Myriophyllum aquaticum*.

Fonte: NOAA great lakes aquatic nonindigenous species information system, 2022.

### 2.6.3 *Pistia stratiotes*

A macrófita *Pistia stratiotes* (Figura 4) é uma erva aquática, da família das Araceae, de hábito flutuante livre ou semi enraizada quando se encontra em águas rasas. Também é conhecida como alface-d'água, flor-d'água, golfo e mururé-pajé no Amazonas; pajé, no Marajó e pasta, no Ceará (POTT; POTT, 2000). Reproduzem-se principalmente por estolões, mas podem se reproduzir também por sementes, sendo estas dispersas pela água. As plantas jovens priorizam o desenvolvimento de folhas, enquanto as adultas priorizam a produção de estolões aumentando sua biomassa consideravelmente durante o período de seca, pois nessa época há uma concentração maior de matéria orgânica e nutrientes na água, e necessitam de muita luz. Alterações antropogênicas, tais como a eutrofização e o aquecimento global, podem promover seu crescimento e provocar a expansão de sua área de distribuição (LORENZI, 2000). Possui origem pantropical, sendo cosmopolita tropical e subtropical, ocorrendo em margens de rios e lagos em todo o Brasil e nas regiões que percorrem o sul dos Estados Unidos à Argentina (AMARAL, 2008; POTT; POTT, 2000).



**Figura 4:** *Pistia stratiotes*.  
Fonte: Autora, 2018

#### 2.6.4 *Eichhornia crassipes*

O aguapé sul-americano (*Eichhornia crassipes*) (Figure 5) é uma espécie nativa da América do Sul (Bacias Amazônica e do Prata), conhecida como Aguapé e Jacinto-d'água. Devido às suas raízes longas, fornece abrigo e alimento para macroinvertebrados e pequenos peixes e é amplamente utilizado como agente fitorremediador em águas contaminadas com metais pesados. Outra aplicação é como planta ornamental, que auxiliou na distribuição mundial da espécie, sendo relatada na Europa, África e Ásia.



**Figure 5:** *Eichhornia crassipes*.  
Fonte: Google, 2022

#### 2.6.5 *Glyceria maxima*

A *Glyceria maxima* (Figura 6) uma gramínea monocotiledônea, foi proposta como organismo-teste pelo documento de orientação da European Food Safety Authority

(EFSA 2013). Alguns estudos foram realizados usando *G. maxima* como organismo-teste na avaliação de risco do herbicida sulfosulfuron para plantas aquáticas não-alvo (DAVIES et al., 2003), avaliação da toxicidade do herbicida simazina em macrófitas aquáticas (VERVLIET-SCHEEBAUM et al., 2010) e, como uma nova espécie de teste para a avaliação de risco da União Europeia para herbicidas (EFSA, 2013; MOHR et al., 2015). Para apoiar o desenvolvimento do protocolo de teste OCDE, pré-testes foram realizados usando os herbicidas isoproturon e imazapyr pelo grupo de trabalho de Wageningen Environmental Research (WUR, NL), Bayer, BASF e Syngenta.



**Figura 6:** *Glyceria maxima*.  
Fonte: Autora, 2020

#### 2.6.6 *Myriophyllum spicatum*

*Myriophyllum spicatum* (Figura 7) *Eurasian watermilfoil* spiked watermilfoil) é nativo da Europa, Ásia e norte da África, mas tem uma ampla distribuição geográfica e climática entre cerca de 57 países, estendendo-se do norte do Canadá à África do Sul. É uma planta aquática submersa, cresce em água parada ou em movimento lento e é considerada uma espécie altamente invasiva.



**Figura 7:** *Myriophyllum spicatum*.  
Fonte: Google, 2022

## **2.8 Comunidade de macroinvertebrados associada à macrófitas aquáticas**

Em ambientes aquáticos, os macroinvertebrados atuam no metabolismo do ecossistema participando da ciclagem de nutrientes e da redução do tamanho das partículas orgânicas, para facilitar a ação de bactérias e fungos (CALLISTO; ESTEVES, 1995; CALLISTO; GOULART; MORETTI, 2001). São importantes também no fluxo de energia e constituem o maior recurso alimentar de outros insetos, peixes e algumas aves insetívoras, sendo sua distribuição relacionada às características morfométricas, físicas e químicas do habitat, à disponibilidade de recursos alimentares e ao hábito das espécies (MERRITT; CUMMINS, 2008).

Devido a seu hábito sedentário, ciclo de vida suficientemente longo que permite uma resposta rápida às alterações ambientais na estrutura das suas populações e comunidades, tamanho de corpo relativamente grande e de fácil amostragem, alta diversidade de espécies que fornecem uma gama de tolerância e amplo espectro de respostas frente a diferentes níveis de contaminação, os macroinvertebrados são amplamente utilizados como bioindicadores de qualidade de água em programas de monitoramento ambiental, principalmente através de inventários de diversidade e estrutura dessas comunidades (BAPTISTA et al., 2007; CORTEZZI et al., 2009; DOUGHTY, 1994). Esses inventários são análise de uma comunidade biológica natural englobando as abordagens de densidade/espécies, diversidade específica, teias alimentares e fluxo de energia, permitindo realizar comparações detalhadas da organização funcional de diferentes comunidades (CALLISTO; ESTEVES, 1995),

aplicando o conceito de guilda trófica, que possibilita o entendimento da distribuição da energia dentro da comunidade, do ponto de vista da diversidade (ODUM, 2005).

Com base no modo de alimentação, os macroinvertebrados podem ser agrupados em cinco categorias: (1) coletores-catadores - alimentam-se de pequenas partículas de matéria orgânica por coleta nos depósitos de sedimento; (2) coletores-filtradores – capturam, por filtração, pequenas partículas de matéria orgânica em suspensão na coluna d'água; (3) fragmentadores - mastigam folhas ou tecido de planta vascular vivo ou escavam madeira; (4) predadores - engolem a presa inteira ou ingerem os fluidos do tecido corporal; (5) raspadores - adaptados a raspar superfícies duras, alimentam-se de algas, bactérias, fungos e matéria orgânica morta adsorvidos aos substratos (MERRITT; CUMMINS, 1996, 2008).

Exemplo do uso de macroinvertebrados como bioindicadores são os trabalhos de: Barbola et al. (2011), que avaliaram a comunidade de macroinvertebrados aquáticos como ferramenta para o monitoramento de um reservatório na bacia do rio Pitangui, Paraná; Marques et al. (1999), que compararam a comunidade de macroinvertebrados bentônicos, em termos de grupos funcionais de alimentação, e avaliaram a estruturação desta comunidade com base nas guildas tróficas de peixes nas lagoas Carioca e da Barra, no Parque Estadual do Rio Doce – MG; Silva et al. (2009), que analisaram os grupos funcionais tróficos (coletores-catadores, coletores-filtradores, fragmentadores, predadores e raspadores) das comunidades de macroinvertebrados de dois reservatórios da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo; e Costa et al., (2006), que realizaram um inventário da diversidade de macroinvertebrados bentônicos do reservatório na Estação Ambiental de Peti, em uma escala espacial e temporal nos períodos de seca e chuvas entre junho de 2002 e junho de 2004.

Como exposto anteriormente, as macrófitas aquáticas fornecem abrigo para diversos grupos de organismos aquáticos, como os macroinvertebrados (ESTEVES, 1998; NEVES; FOLONI; PITELLI, 2002), que se destacam como um dos principais grupos da fauna associada às macrófitas aquáticas (DE NEIFF, 2003; MALTBY et al., 2010; MERRITT; CUMMINS, 1996). A abundância e diversidade de macroinvertebrados associados às macrófitas são resultantes das condições favoráveis para muitos grupos animais, tanto como habitat como fonte alimentar para herbívoros e consumidores de perifíton, e conseqüentemente para predadores destes animais (ALBERTONI; PALMA-SILVA, 2006; DVOŘAKI; BESTZ, 1982; WOLCOX; MEEKER, 1992). Assim, sua biomassa e densidade influenciam diretamente a densidade

e composição da comunidade associada (ALBERTONI; PALMA-SILVA; DE ASSIS ESTEVES, 2001; ESTEVES, 1998; SAULINO; TRIVINHO-STRIXINO, 2014). Por essas razões, os estudos sobre a comunidade de macroinvertebrados associados às macrófitas aquáticas são vastos (ALBERTONI; PALMA-SILVA; DE ASSIS ESTEVES, 2001; ESTEVES, 1998; SAULINO; TRIVINHO-STRIXINO, 2014).

## **2.9 Serviços ecossistêmicos prestados pelas macrófitas aquáticas**

Na literatura existem algumas definições de serviços ecossistêmicos, sendo as mais utilizadas as de Daily (1997) que define como “... as condições e processos pelos quais os ecossistemas naturais, com as espécies que os compõem, sustentam a vida humana” e, a de MEA (2005), que define como “os benefícios que as populações humanas derivam, direta ou indiretamente, das funções ecossistêmicas”. Ambas trazem a ideia de que os serviços são processos ou funções de valor para a humanidade (FARLEY; COSTANZA, 2010), caracterizados em: serviços de provisão, como alimentos, fibras, fármacos e água; serviços de regulação, como a manutenção da qualidade da água e regulação climática; serviços de suporte, como a ciclagem de nutrientes e a dispersão de sementes e, serviços culturais, como a recreação (ANDRADE; ROMEIRO, 2009; MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT, 2005).

Entre os exemplos dos serviços ecossistêmicos prestados pelas macrófitas aquáticas estão i) o fornecimento de abrigo e alimento para fauna diversificada; ii) em conjunto com as microalgas desempenha o papel de produtora primária; e iii) sua participação na ciclagem e estocagem de nutrientes e a manutenção das características físicas e químicas da água (BOYD, 1969; BROCK et al., 1983; CAINES, 1965; ESTEVES, 1998; POTT; POTT, 2000; RIEMER; TOTH, 1969).

A poluição de ecossistemas aquáticos por contaminantes tóxicos pode causar mudanças na estrutura e funções destas comunidades (QURESHI et al., 2016), como é o caso dos agrotóxicos amplamente utilizados na agricultura, que além de seus efeitos tóxicos, atinge a organismos não-alvos (ARTS et al., 2006; DIEPENS et al., 2014). Assim, a perda ou as alterações na biodiversidade impacta negativamente as funções e serviços ecossistêmicos (ANDRADE; ROMEIRO, 2009). Considerando a fauna associada como exemplo, Albertoni et al., (2006; 2001) explicam que a biomassa e densidade de macrófitas aquáticas no sistema influenciam diretamente a densidade e composição da comunidade associada de macroinvertebrados, assim, quando as

macrófitas sofrem alguma perturbação, por consequência, a comunidade de macroinvertebrados também é afetada.

Martins & Pitelli (2005b) avaliaram os impactos causados pelo controle da *Eichhornia crassipes* (aguapé) com o herbicida diquat e sobre algumas características de qualidade da água em mesocosmos em cinco situações: CPCH - mesocosmo colonizado por aguapé, o qual foi controlado pela aplicação do herbicida diquat; CPCG - mesocosmo colonizado por aguapé, o qual foi morto por congelamento; CPSH - mesocosmo colonizado com aguapé, sem controle; SPCH - mesocosmo sem macrófitas e com aplicação de diquat na superfície da água; e SPSH - mesocosmo sem macrófitas aquáticas e sem aplicação. Os autores demonstraram que as concentrações de oxigênio dissolvido foram menores nos mesocosmos colonizados pelo aguapé e também tiveram rápida redução após o controle das plantas tanto com diquat como por congelamento. Os valores de pH da água foram superiores nos mesocosmos sem a cobertura da macrófita. Os valores de sólidos totais dissolvidos (STD) e de condutividade elétrica foram maiores nos tratamentos com morte por congelamento e pelo diquat e em mesocosmos colonizados sem controle da macrófita. Esse efeito pode ser devido à presença de material orgânico em suspensão e à maior concentração de nutrientes presentes na água. Os autores concluíram que as alterações nos valores das concentrações de oxigênio dissolvido, sólidos dissolvidos totais e os valores de pH e condutividade elétrica estão relacionados à morte e decomposição das plantas e a cobertura de macrófitas sem controle contribuiu para redução do pH e da concentração de oxigênio dissolvido da água.

### 3. JUSTIFICATIVA

O desafio fundamental para a sustentabilidade é atender às necessidades de uso dos recursos naturais da sociedade sem comprometer o fornecimento desses para gerações futuras (LIU et al., 2015). Para tanto, entender as interações entre o homem e a natureza, buscando maneiras de gerenciar, manter e restaurar os serviços ecossistêmicos surge como uma necessidade e isso vêm sendo avaliado ao longo dos últimos anos, procurando-se responder: até onde se pode explorar os ecossistemas sem causar danos não sustentáveis e assim inaceitáveis? Até quando a Terra suportará tal pressão? É realmente necessário todo esse aporte de recursos naturais para o desenvolvimento da humanidade?

Krebs et al., Solan et al., Hector & Bagchi (2007), Isbell et al., (2011) e Naeem et al., (2012) apontam que os ecossistemas, em todo o mundo, estão perdendo sua diversidade funcional como resultado da apropriação humana dos recursos naturais, causando como impactos a perda da diversidade de espécies e de diversos habitats, por exemplo.

Abordando a discussão sobre os efeitos dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos, Zagatto & Bertoletti (2008) explicam que esses contaminantes absorvidos diretamente, a partir do ambiente, ou indiretamente, através do alimento contaminado, podem ser transferidos de um nível trófico a outro, podendo chegar à níveis letais ou subletais e são observados em organismos aquáticos pertencentes a diferentes níveis tróficos como algas e macrófitas (produtores), microcrustáceos e moluscos (consumidores primários), e peixes (consumidores secundários e terciários). Assim, justifica-se o desenvolvimento da pesquisa que pretende abranger dois níveis: macrófitas aquáticas e macroinvertebrados, com o intuito de identificar e quantificar os efeitos das formulações comerciais do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil, isolados e em misturas.

Cabe ressaltar também a importância da realização de estudos ecotoxicológicos em regiões tropicais, uma vez que, segundo Kwok et al., (2007), cerca de 75% da biodiversidade mundial está localizada nessas regiões, sendo que em relação aos ecossistemas aquáticos tropicais estes também apresentam uma biodiversidade substancialmente superior quando comparada com os ambientes localizados em clima temperado.

Além disso, devido ao desenvolvimento de atividades agrícolas, a falta de políticas e regulamentações adequadas para a proteção ambiental, com destaque à contaminação por agrotóxicos, diversos estudos têm apontado para a importância de se

estabelecer critérios e técnicas de gerenciamento de risco ecológico que visem promover a proteção de ambientes tropicais, que atualmente vem sendo altamente impactados por ação antrópica (DAAM et al., 2019; DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; ZAGATTO, 2008).

Por fim, cabe ressaltar que esta tese está vinculada ao projeto temático FAPESP nº 15/18790-3, intitulado “*Environmental effects of the pasture-sugarcane conversion and pasture intensification*”, que tem por objetivo avaliar as consequências ambientais da intensificação do uso da terra e seus efeitos na dinâmica da água, carbono, nitrogênio e fósforo e, como a poluição (pesticidas) e a modificação da paisagem (Cerrado – Pasto – Agricultura) afetam a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas.

#### 4. HIPÓTESES

Diante o exposto, a presente pesquisa trouxe como hipóteses:

I. Quando testadas em escala laboratorial, as concentrações ambientalmente realísticas do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil (isolados e em mistura) causam efeitos no crescimento, desenvolvimento (tamanho e biomassa) e aparato fotossintético (clorofila *a* *b* e total e carotenoide) nas macrófitas aquáticas *Landoltia punctata* e *Myriophyllum aquaticum*.

II. A presença dos contaminantes 2,4-D e fipronil (isolados e em mistura) testados em escala de modelos ecossistêmicos e em doses recomendadas para o cultivo de cana-de-açúcar afetam o desenvolvimento (crescimento de caule, raízes e biomassa) das macrófitas aquáticas *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes*, bem como as concentrações dos nutrientes nitrogênio, fósforo e carbono disponível para as plantas e, conseqüentemente, a fauna associada de macroinvertebrados, ocasionando a redução de riqueza e diversidade, afetando diretamente os grupos funcionais.

III. A vinhaça, utilizada no manejo nas culturas de cana-de-açúcar, em combinação com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil, pode causar efeitos no desenvolvimento das macrófitas *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes*, ocasionando a redução de riqueza e diversidade na fauna associada de macroinvertebrados, afetando diretamente os grupos funcionais.

IV. Espécies de clima temperado, como *Glyceria maxima* (monocotiledônea) e *Myriophyllum spicatum* (dicotiledônea), quando expostas ao herbicida 2,4-D, apresentam respostas diferentes (efeitos) quando comparadas às espécies tropicais.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Geral:

A presente pesquisa teve como objetivo geral identificar e avaliar os efeitos da utilização das formulações comerciais do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil (isolados e em misturas), combinados com práticas de manejo de aplicação de herbicida e inseticida combinados com vinhaça empregadas na conversão de áreas de pastagens para o cultivo de cana-de-açúcar ou áreas com o cultivo de cana-de-açúcar já estabelecido, em macrófitas aquáticas e comunidade associada de macroinvertebrados.

### 5.2 Específicos:

I. Analisar os efeitos das concentrações ambientalmente realísticas do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil (isolados e em mistura) no crescimento, desenvolvimento (tamanho e biomassa) e aparato fotossintético (clorofila *a*, *b* e total e carotenoide) das macrófitas aquáticas *Landoltia punctata* e *Myriophyllum aquaticum*.

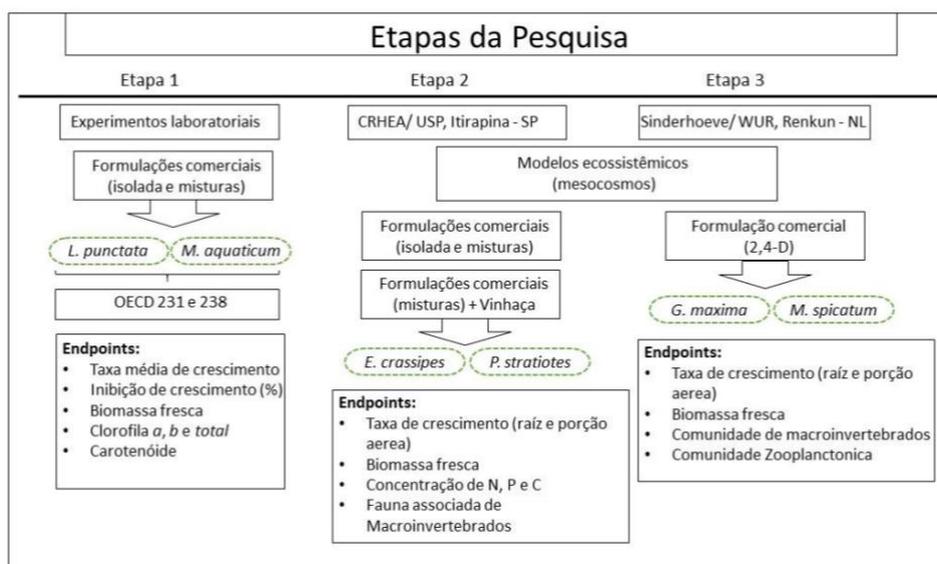
II. Avaliar, em escala de modelos ecossistêmicos, como as práticas de manejo utilizadas no cultivo da cana-de-açúcar (aplicação de pesticidas e da vinhaça) afetam o desenvolvimento (crescimento de caule, raízes e biomassa) das macrófitas aquáticas *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes*, a assimilação de nitrogênio, fósforo e carbono e, conseqüentemente a fauna associada de macroinvertebrados (riqueza e diversidade).

III. Avaliar os efeitos do herbicida 2,4-D, em escala de modelos ecossistêmicos, nas espécies de macrófitas aquáticas de clima temperado, *Glyceria maxima* e *Myriophyllum spicatum*, verificando similaridades ou não nos efeitos observados.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Delineamento experimental

Com a finalidade de gerar dados que auxiliem na discussão dos efeitos dos contaminantes 2,4-D e fipronil em ambientes aquáticos, a presente pesquisa foi dividida em três etapas: 1) experimentos laboratoriais, 2) modelos ecossistêmicos em clima tropical (Itirapina – SP, Brasil) e 3) modelos ecossistêmicos em clima temperado (Renkun, Países Baixos), conforme apresentado abaixo (Figura 8).



**Figura 8:** Esquema das etapas desenvolvidas durante a pesquisa.  
Fonte: Autora, 2022

Na etapa 1 foram realizados experimentos em laboratórios com duas espécies de macrófitas aquáticas, *L. punctata* e *M. aquaticum*. Para esse experimento foram adotadas concentrações ambientais dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, de acordo com o Relatório de qualidade da água doce da CETESB (2018) que reporta a presença de 25 agrotóxicos (herbicidas, inseticidas, fungicidas, organoclorados e organofosforados) em 22 diferentes pontos de corpos d'água distribuídos pelo Estado de São Paulo, próximos a cultivos de cana-de-açúcar, café, citros, milho, amendoim e eucalipto.

A etapa 2 consistiu em testes em modelos ecossistêmicos em clima tropical, seguindo as práticas empregadas nos cultivos de cana-de-açúcar: aplicação de herbicida, inseticida e vinhaça. Para o presente estudo foram adotadas concentrações recomendadas para o cultivo de cana-de-açúcar seguindo as orientações dos fabricantes indicadas nos rótulos dos produtos comerciais. Nesta etapa duas espécies de macrófitas aquáticas foram

utilizadas, *P. stratiotes* e *E. crassipes*. Além dos efeitos observados nas macrófitas, a fauna de macroinvertebrados associada às raízes das plantas também foram estudados.

Por fim, na etapa 3, um experimento em modelos ecossistêmicos em clima temperado foi realizado testando diferentes concentrações do herbicida 2,4-D em duas espécies de macrófitas aquáticas, *G. maxima* e *M. spicatum*. Neste experimento também foram analisados os efeitos das concentrações testadas nas comunidades de macroinvertebrados e zooplâncton.

## **6.2 Contaminantes**

Para a presente pesquisa três contaminantes foram avaliados:

- a) 2,4-D: formulação comercial DMA® 806 BR (Dow AgroSciences Industrial Ltda., Brasil) que contém 670 g/L do ingrediente ativo 2,4-D em sua composição.
- b) Fipronil: formulação comercial Regent® 800 WG (BASF S.A) contendo 800 g/kg do ingrediente ativo fipronil em sua composição.
- c) Vinhaça.

A escolha dos contaminantes foi baseada nas práticas agrícolas empregadas no cultivo de cana-de-açúcar, considerando uma extensa pesquisa junto aos produtores e usineiros, bem como um amplo levantamento na literatura, ambos realizados pelo grupo de pesquisadores envolvidos no Projeto Temático FAPESP nº 15/18790-3, intitulado “*Environmental effects of the pasture-sugarcane conversion and pasture intensification*”, que contou com a participação de profissionais da USP (Esalq, EESC, EACH), Unicamp, UFSCar (Campus Sorocaba e São Carlos), APTA (Brotas/SP).

## **6.3 Etapa 1: Experimentos em laboratório**

### **6.3.1 Organismos-teste**

Para o presente estudo, foram selecionadas duas espécies tropicais: *Landoltia punctata* (Figura 2) e *Myriophyllum aquaticum* (Figura 3). Ambas foram coletadas na cultura mantida no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, localizado no município de Itirapina, Estado de

São Paulo, Brasil. As macrófitas foram lavadas com água da torneira e desinfetadas com solução de água e 0,5% de hipoclorito de sódio por um minuto. Em seguida, as plantas foram aclimatadas em sala de teste em meio de cultivo Steinberg (2005), com luz controlada (6500 – 9000 lux), fotoperíodo (16:8-h claro/escuro) e temperatura ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 7 dias antes da realização dos testes.

### **6.3.2 Concentrações testadas (isoladas e misturas)**

As plantas foram expostas a cinco concentrações isoladas e 25 combinações de ambos os agrotóxicos (Tabela 1) usando o delineamento de modelagem fatorial completo (FREITAS et al., 2019; MOREIRA et al., 2021; PINTO et al., 2021a, 2021b). As concentrações foram escolhidas com base nas concentrações ambientais reportadas no “Relatório de Qualidade da Água” da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2018), onde para o fipronil foi de 465  $\mu\text{g/L}$  e para o 2,4-D foi 366  $\mu\text{g/L}$ . Considerando o pior cenário, para o presente estudo foram testadas concentrações oito vezes maiores que a reportada para o 2,4-D e, doze vezes maior para o fipronil. Assim as concentrações testadas para o DMA® 806 BR foram 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 2,4 mg i.a./L (preparadas a partir de uma solução estoque de 6,7 g i.a./L); e para o Regent® 800 WG as concentrações foram de 0,25; 0,5; 1, 2 e 3 mg/L (preparadas a partir de uma solução estoque de 3,2 mg i.a./L).

**Tabela 1:** Concentrações de 2,4-D e fipronil (isoladas e misturas) testadas nos bioensaios laboratoriais de *Landoltia punctata* e *Myriophyllum aquaticum*

<b>Concentrações da exposição isolada (em mg/L)</b>			
<b>2,4-D</b>		<b>Fipronil</b>	
Código	Concentração	Código	Concentração
D1	0.3	F1	0.25
D2	0.6	F2	0.5
D3	0.9	F3	1 <sup>1</sup>
D4	1.2	F4	2
D5	2.4	F5	3
<b>Misturas</b>			
M1	D1 + F1	M14	D3 + F4
M2	D1 + F2	M15	D3 + F5
M3	D1 + F3	M16	D4 + F1
M4	D1 + F4	M17	D4 + F2
M5	D1 + F5	M18	D4 + F3
M6	D2 + F1	M19	D4 + F4
M7	D2 + F2	M20	D4 + F5
M8	D2 + F3	M21	D5 + F1
M9	D2 + F4	M22	D5 + F2
M10	D2 + F5	M23	D5 + F3
M11	D3 + F1	M24	D5 + F4
M12	D3 + F2	M25	D5 + F5
M13	D3 + F3		

### 6.3.3 Design experimental

Os testes semi-estáticos foram baseados nas normas da OECD (2006, 2014), com modificações de temperatura ( $25^{\circ}\pm 2$ ) e fotoperíodo (16 claro/ 8escuro), sendo realizados em potes plásticos atóxicos de 100 mL (para *L. punctata*) e 550 mL (para *M. aquaticum*),

em meio Steinberg (2005) por 7 dias, nas mesmas condições descritas para o cultivo (temperatura, luz e fotoperíodo). Cada tratamento de *L. punctata* começou com 12 frondes por pote e para o *M. aquaticum* com um broto (de 10 cm de tamanho) por pote. Os testes foram validados após 48 horas para *L. punctata* e 7 dias para *M. aquaticum* usando a equação *Doubling time* (Dt):  $Td = \ln 2 / \mu$  (Eq. 1) (2006, 2014), onde  $\mu$  é o valor médio de crescimento específico avaliado. Após quatro dias de exposição, o peso e tamanho de *M. aquaticum* foram constantes nas concentrações de 2,4-D e nas misturas; por este motivo, o teste foi finalizado no sétimo dia após a validação descrita acima.

### 6.3.4 Endpoints analisados

Para ambas as macrófitas foram calculadas a taxa média de crescimento específico (tamanho total do comprimento da parte aérea e frondes), a taxa de inibição da taxa de crescimento (%), biomassa fresca, clorofila *a*, *b*, *total* e carotenoide. A taxa média de crescimento específico foi calculada para cada grupo de tratamento e grupo de controle usando a equação 2.

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln \ln (N_j) - \ln \ln (N_i)}{t} \text{ (Eq. 2)}$$

Onde:  $\mu_{i-j}$ : é a taxa média de crescimento específico do tempo *i* até *j*;

$N_j$ : valor reportado no momento *i*;

$N_i$ : valor reportado no momento *j* e,

*t*: tempo de *i* a *j*.

A porcentagem de inibição da taxa de crescimento foi calculada para cada concentração do teste (grupos de tratamento) de acordo com a equação 3.

$$\%Ir = \frac{(\mu_c - \mu_t)}{\mu_c} \times 100 \text{ (Eq. 3)}$$

Onde:  $\%Ir$ : porcentagem de inibição da média de crescimento específico;

$\mu_c$ : valor de  $\mu$  no controle e,

$\mu_t$ : valor de  $\mu$  nos tratamentos.

### 6.3.5 Análise de pigmentos

Os pigmentos clorofila *a*, *b* e *total* e carotenoides foram quantificados utilizando um espectrofotômetro (comprimentos de onda 450, 649 e 665 nm). As análises dos pigmentos das macrófitas *L. punctata* e *M. aquaticum* foram realizadas após a extração de 0,2 mg em acetona (99,1%) da clorofila *a*, *b* e *total* pelo método de Hiscox & Israelstam (1979). Após a leitura, os valores foram calculados de acordo com Wellburn (1994). Os valores de carotenoides foram calculados de acordo com Lalau et al., (2015).

### 6.3.6 Análises químicas dos agrotóxicos

As soluções estoque de 100 mg i.a./L de 2,4-D (DMA® 806BR – 67% w:v de ingrediente ativo) e 3,2 mg i.a./L de fipronil (Regent® 800WG - 80% w:v de ingrediente ativo) foram quantificados usando o modo negativo de cromatografia Agilent 1200 acoplado a um espectrômetro de massa Triplo Quadrupolo com ionização por eletrospray (ESI) (Agilent 6410). O Limite de Quantificação (LOQ) do método foi de 1 µg/L para 2,4-D e 0,1 µg/L para fipronil (GOULART et al., 2020). As concentrações nominais de fipronil e 2,4-D foram quantificadas a partir das concentrações dos ingredientes ativos nas soluções estoque após a preparação. As concentrações médias determinadas foram de  $1,3 \pm 10,4$  mg i.a./L para o 2,4-D e  $5,3 \pm 0,16$  g a.i./L para o fipronil.

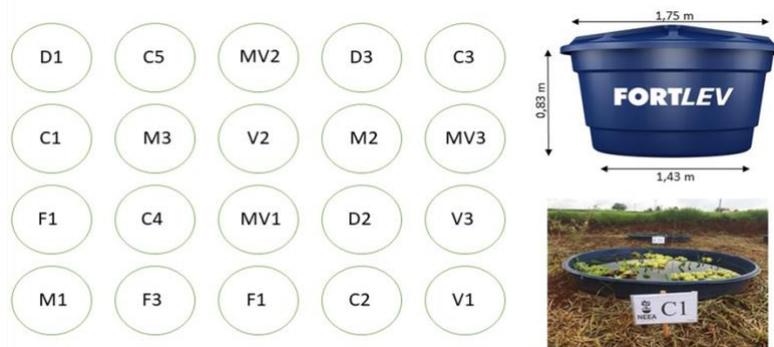
### 6.3.7 Análises de dados

A concentração de efeito de 50, 20 e 10% ( $EC_{50}$ ; 20; 10) para *L. punctata* foi calculada usando o número de frondes, taxa de crescimento e porcentagem de inibição de crescimento. Para a espécie *M. aquaticum* foi utilizado o comprimento total da parte aérea e taxa de crescimento específico. A regressão não linear com a curva logística de três parâmetros foi calculada usando o software Statistica versão 7.0 (StatSoft, 2004). As comparações dos tratamentos com o grupo controle e entre os tratamentos foram realizadas com um nível de confiança de 95% ( $p \leq 0.05$ ) usando Modelos Lineares Generalizados (GLM) com a família Gaussiana e a função de vínculo de identidade no software R 3.6.0 (2009), com a aplicação do RStudio versão 1.2.1335 (2019). O pressuposto GLM de independência entre os tratamentos foi atendido, e o intervalo de confiança foi de 95% ( $p < 0.05$ ) (MOREIRA et al., 2020; PINTO et al., 2021a).

## **6.4 Etapa 2: Experimentos em modelos ecossistêmicos – clima tropical**

### **6.4.1 Design experimental**

O experimento foi realizado no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada, no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (NEEA/CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC/USP), Itirapina, Brasil. Vinte mesocosmos circulares de polipropileno de 1.500 litros foram enterrados abaixo do nível do solo. Cada mesocosmo foi preenchido com 20 cm de solo natural e água proveniente do poço artesiano que abastece o centro de pesquisa. Antes do período de estabilização (6 meses) em cada unidade experimental foram adicionadas amostras da comunidade planctônica (zooplâncton e fitoplâncton, provenientes da represa do Lobo, Itirapina/SP) e exemplares das macrófitas aquáticas que seriam avaliadas no presente estudo (*Eichhornia crassipes*, *Myriophyllum aquaticum*, *Salvinia auriculata* e *Pistia stratiotes*). Após o período de estabilização, os mesocosmos foram divididos aleatoriamente em seis tratamentos (Figura 9): Controle (C1; C2; C3; C4; C5), DMA®806BR (i.a. 2,4D) (D1; D2; D3), Regent®800WG (i.a. fipronil) (F1; F2; F3), Mistura de DMA® e Regent® (M1; M2; M3), Vinhaça (V1; V2; V3) e Mistura dos agrotóxicos com vinhaça (MV1; MV2; MV3). Excluindo o Controle (com 5 réplicas), todos os tratamentos foram realizados com três réplicas.



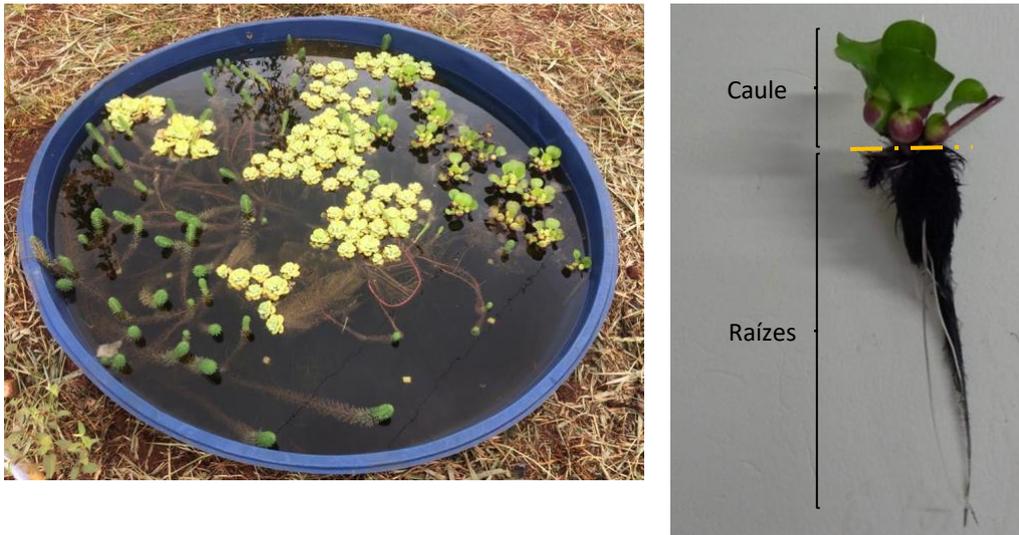
**Figura 9:** Esquema de distribuição dos tratamentos e as dimensões dos mesocosmos.  
 Fonte: Autora, 2022

Conforme apresentado por Pinto et al. (2021a), a dose dos agrotóxicos aplicados foi baseada nas recomendações dos fabricantes para a cultura da cana-de-açúcar na fase de pé-emergência: 3,5L de DMA®806BR/ha (correspondente a 2,35 kg i.a. 2, 4-D/ha) e 500g de Regent800WG/ha (correspondente a 400 g i.a. de fipronil/ha), sendo que as concentrações nominais esperadas foram de 447 µg/L de 2,4-D e 64 µg/L de fipronil nos tratamentos isolados e mistos. Para a vinhaça, foi adicionado um volume de 20 L nos tratamentos V e MV, com concentração esperada de 1,3% (v/v), seguindo as orientações dos agricultores (comunicação pessoal).

#### 6.4.2 Frequência de amostragem

O experimento foi iniciado em 2018 e finalizado em 2019. Considerando desde o período de instalação (9 de março de 2018), adição das macrófitas aquáticas e comunidades zooplancônicas e fitoplancônicas (17 de março de 2018) estabilização (março a novembro de 2018), sendo que as coletas tiveram início em 24 de novembro de 2018, dois dias antes da contaminação. As coletas foram realizadas dois antes da aplicação dos agrotóxicos e da vinhaça (*t0*): 24/11/2018, e 7 dias (*t1*): 03/12/2018, 30 dias

( $t_2$ ): 26/12/2018 e, 75 dias ( $t_3$ ): 07/02/2019 após a contaminação. Nos dias de amostragens foram coletados três indivíduos de cada espécie de macrófitas, em cada réplica e tratamento. As plantas foram posteriormente lavadas com água corrente, obtendo-se a biomassa fresca total (balança Mettler) e as medidas de comprimento do caule e das raízes (Figura 10). A biomassa seca foi obtida após a secagem das plantas a 45 °C, por 72 horas (POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS, 2003).



**Figura 10:** Culturas de *E. crassipes* estabelecidas nos mesocosmos e demonstração de como a macrófita *Eichhornia crassipes* foi dividida entre caule e raízes.

Fonte: Autora, 2022

Para *P. stratiotes* foi possível acompanhar diretamente o crescimento das raízes assim como a colonização por macroinvertebrados, uma vez que todos os indivíduos tiveram suas raízes lavadas e cortadas para padronização do tamanho. Nove indivíduos foram distribuídos e alocados em anéis (com três divisões) em cada mesocosmo (Figura 11), permitindo separar as macrófitas selecionadas para o estudo da comunidade já ali estabelecida. No total, três amostragens foram realizadas no  $t_1$ : 7,  $t_2$ : 3 e  $t_3$ : 75 dias após a contaminação e os *endpoints* analisados foram tamanho total do caule e das raízes (cm) e biomassa fresca (gr).



**Figura 11:** Preparação e distribuição das macrófitas *Pistia stratiotes*.  
Fonte: Autora, 2022

#### 6.4.3 Quantificação dos nutrientes P, N e C nas plantas

Para a análise das concentrações de nitrogênio e fósforo na biomassa da *E. crassipes* e *P. stratiotes*, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e levadas para secagem em estufa (Binder - FED), a 70 °C por 48 horas. Após este período, as macrófitas foram moídas em moedor (Moulinex A505) e acondicionadas em dessecadores de vidro com sílica gel e fechado a vácuo até a realização das análises.

Seguindo a metodologia descrita por Esteves e Camargo (1998) a concentração de nitrogênio total na biomassa da *E. crassipes* e *P. stratiotes* foi determinada a partir de 0,3 g de biomassa seca, a qual foi moída e digerida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em bloco digestor, seguido por destilação e titulação com ácido sulfúrico a 0,05 N, sendo os valores expressos em porcentagem.

A análise da concentração de fósforo total seguiu a metodologia de Andersen (1976), onde 0,2 g de biomassa seca e moída das macrófitas foram aquecidas em mufla, digeridas em chapa com HCl 1 N, seguindo pela adição de reagente misto e leitura em comprimento de onda de 880 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-2101 PC – UV – VIS Scanning), sendo os valores expressos em µg.g.

Para a quantificação de carbono, as amostras foram acondicionadas e lacradas em cápsulas de estanho e, em seguida, incineradas a uma temperatura de aproximadamente 950°C por 5 min em um tubo de combustão de quartzo, utilizando gás O<sub>2</sub> como carreador, com 99,998% de pureza. Após a combustão, toda a matéria orgânica

foi convertida em CO<sub>2</sub> e um sensor infravermelho detectou a quantidade de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) gerada pela combustão, relacionando-a automaticamente com a quantidade de C elementar na amostra (NELSON; SOMMERS, 1996).

#### **6.4.4 Fauna de macroinvertebrados associados às raízes das macrófitas**

Após as coletas, as raízes das plantas foram cuidadosamente lavadas em água corrente para remover a macrofauna associada. A macrofauna foi armazenada em potes plásticos de 250 mL com tampa e conservadas com etanol 70 °C. As amostras foram triadas com o auxílio de uma mesa de luz de LED e identificadas utilizando uma lupa Stemi SV6. A identificação foi feita em nível de família, seguindo o Manual de Identificação de Macroinvertebrados Aquáticos do Estado do Rio de Janeiro (2012), Chave de Identificação das principais Ordens e Famílias de Insetos Aquáticos adaptada de Maccafferty, W.P (1981) e Hamada et al., 2014. Após identificação e contagem, foram obtidos os valores de riqueza e diversidade de acordo com o índice de Shannon-Wiener baseia-se na avaliação da abundância proporcional das espécies identificadas na amostra, observando também aspectos como riqueza de espécies (Shannon, 1948).

#### **6.4.5 Variáveis físicas e químicas da água**

Os valores de temperatura, pH, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido (OD) foram medidos durante o experimento utilizando a sonda multiparâmetros YSI - ProDSS. Amostras de água também foram coletadas para análises de nutrientes totais e dissolvidos, seguindo as metodologias de Machereth et al., (1978) para nitrito e nitrato, íon amônio (Koroleff, 1976) e, fosfato total dissolvido, fosfato inorgânico dissolvido nitrogênio orgânico total (APHA, 1995) e silicato (Golterman et al., 1978).

#### **6.4.6 Quantificação dos agrotóxicos**

Amostras de água foram coletadas para determinação das concentrações dos agrotóxicos (2,4-D e fipronil) antes da contaminação e a cada dia de amostragem (i.e., 1 dia antes da dosagem (*t*<sub>0</sub>), 7 dias (*t*<sub>1</sub>), 31 dias (*t*<sub>2</sub>) e 73 dias (*t*<sub>3</sub>) após o dia da contaminação; conforme apresentado na seção 6.4.2). Os agrotóxicos foram extraídos de

amostras de 500 mL de água, pré-filtradas em filtros de fibra de vidro (GF/C Whatmann), por Extração em Fase Sólida (SPE) em colunas OASIS HLB EC-C18 (500 mg, 6cc, Waters) (MONTAGNER et al., 2014). As quantificações dos agrotóxicos foram realizadas através de Cromatografia Líquida em Espectrometria de Massa (LC-MS/MS) usando um cromatógrafo Agilent 1200 acoplado a um espectrômetro de massa Triplo Quadrupolo com ionização por eletrospray (ESI) (Agilent 6410) em modo ativo. Os compostos foram monitorados por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). A separação cromatográfica foi feita com uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1 × 30 mm, tamanho de partícula 3,5 µm) a 30 °C. O Limite de Quantificação (LOQ) foi obtido usando o método de sinal comparando o sinal analítico de amostras em baixas concentrações de 2,4-D e fipronil com o ruído na linha de base (proporção 10:1) (FREITAS et al., 2019). Nas condições analíticas aplicadas, o LOQ do método para 2,4-D e fipronil foi de 5,0 ng/L e 0,1 ng/L, respectivamente.

#### **6.4.7 Análises estatísticas**

Todos os resultados obtidos (tamanho da porção aérea e das raízes, biomassa fresca, índices ecológicos e concentração de nutrientes) foram analisados através de General Linear Models (GLM) no R versão 3.6.0 (2009) com a aplicação do RStudio versão 1.2.1335 (2019). As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas com o teste posthoc de Fisher. Uma análise ANOVA de design misto foi aplicada para permitir uma comparação entre os resultados e o tempo (amostragens). Antes de todas as análises, a normalidade e a homogeneidade dos dados foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Diferenças significativas entre os grupos foram aceitas em  $p < 0.05$ .

Para as análises da comunidade de macroinvertebrados, as curvas de resposta principal (PRC) usando o pacote de software CANOCO, 3.12 (BRAAK; SMILAUER, 2002) foram aplicadas, resultando em um diagrama que mostra o dia de amostragem no eixo x e o primeiro componente principal dos efeitos nos tratamentos no eixo y. Conforme explicado por Moreira et al., (2021), os desvios no tempo dos tratamentos em relação ao controle estão presentes em um diagrama. Os pesos das espécies são mostrados em um diagrama separado, no qual indicam a afinidade que a espécie tem com o padrão na PRC. Espécies com peso positivo elevado apresentam resposta semelhante à indicada pelo

PRC, enquanto as de peso negativo apresentam resposta oposta à indicada pelo PRC. Espécies com peso próximo a zero não são influenciadas pelos tratamentos considerados ou apresentam uma resposta que não é representada pelo PRC.

## 6.5 Etapa 3: Experimentos em modelos ecossistêmicos – clima temperado

### 6.5.1 *Design* experimental

O experimento foi conduzido em vinte e seis microcosmos cilíndricos de polietileno de cor branca enterrados no nível da superfície da água (altura: 67 cm, diâmetro interno: 45 cm, profundidade: 50 cm e volume  $\pm 0,08\text{m}^3$ ), localizados na área externa do Centro de pesquisa de Sinderhoeve, do Wageningen Environmental Research, Renkum, Países Baixos (Figura 12).



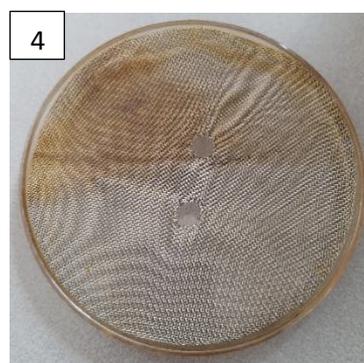
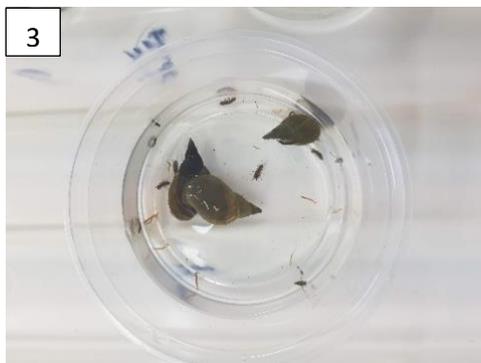
**Figura 12:** Representação das dimensões dos mesocosmos e da área de estudo

Fonte: Autora, 2022

### 6.5.2 Preparação dos mesocosmos: 14 dias antes da contaminação (-14)

Neste experimento foram avaliados os efeitos tóxicos do 2,4-D sobre duas espécies de macrófitas aquáticas: *G. maxima* e *M. spicatum*. Os exemplares de *G. maxima* foram obtidos de um fornecedor comercial (AquaFlora, Aquarium B.V., Países Baixos) e os de *M. spicatum* foram provenientes das culturas estabelecidas no Centro de Pesquisa de Sinderhoeve.

Os microcosmos experimentais foram previamente lavados e posteriormente preenchidos com água subterrânea do local. Catorze (14) dias antes da contaminação, 180 vasos de *G. maxima* (3 plantas de 10-11 cm de comprimento, 2 folhas e 2-4 cm de raiz por vaso) e 180 vasos de *M. spicatum* (3 brotos com 10 cm comprimento e 2 brotos laterais por vaso) foram plantados em vasos de plástico quadrados (9 cm de comprimento, 9 cm de largura, 9,5 cm de altura) contendo substrato e sedimento misturados e coberto com uma camada de 1 cm de areia Geba White. Posteriormente, três vasos de *G. maxima* e de *M. spicatum* foram distribuídos aleatoriamente, em cada um dos 26 microcosmos (Figura 11).



**Figura 13:** Etapas de instalação dos microcosmos. **1:** Limpeza dos microcosmos; **2:** microcosmos limpos e cheios de água; **3:** macroinvertebrados adicionados aos microcosmos; **4:** armadilha utilizada para os macroinvertebrados; **5:** microcosmos finalizados e, **6:** distribuição das plantas nos microcosmos.

Além das plantas, no mesmo dia (i.e., 14 dias pré-aplicação), em cada microcosmos foram adicionados 100 mL de uma cultura multi-espécies de zooplâncton (provenientes do cultivo do laboratório do Centro de pesquisa). Os macroinvertebrados introduzidos compreendiam todos os grupos funcionais alimentares: dez indivíduos de Chironomidae (coletores alternativos e filtradores, predadores), três de Corixidae (predadores), dez de *Asellus* (tritadores) e três de Planorbidae (raspadores), os quais foram coletados em valas não contaminadas no Centro de pesquisa. *Litterbags* constituídos por placas de Petri com 3 g de folhas secas foram colocadas no fundo de cada microcosmos como armadilha, alimento e substrato para os macroinvertebrados.

### 6.5.3 Tratamentos

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do crescimento e estresse em duas formas diferentes de crescimento de macrófitas. As concentrações foram baseadas em uma revisão de literatura sobre concentrações de efeito não observado (CENO) para o pior cenário onde os efeitos de inibição do crescimento eram esperados. Assim, as concentrações adotadas foram: Controle, T1: 1 µg/L; T2: 10 µg/L; T3: 100 µg/L; T4: 1000 µg/L e T5: 3000 µg/L de 2,4-D. A solução estoque aplicada aos microcosmos foi preparada utilizando a água subterrânea local e cada microcosmo foi tratado utilizando 1 L de solução de dosagem contendo a formulação comercial DMA® 806 BR. Para cada nível de concentração, uma solução de dosagem individual foi aplicada por diluição da solução estoque. Os microcosmos de controle receberam apenas 1 L de água subterrânea.

### 6.5.4 Amostragem

O experimento teve duração cinco meses, desde a instalação dos microcosmos em 26 de abril de 2020, adição das macrófitas e macroinvertebrados em 20 de maio de 2020, aclimatação (maio a junho de 2020), assim, dentro desse período três (3) coletas foram realizadas, sendo elas: 03/06/2020 dia 0, antes da contaminação e, nos dias 14

(17/06/2020) e 28 após a contaminação, 01/07/2020. Como condição inicial, no dia 0, foram medidos 20 indivíduos de cada espécie de macrófita. Para *G. maxima* os parâmetros medidos foram: comprimento total das folhas (cm), biomassa fresca das folhas e raízes (gr). Para *M. spicatum* foram efetuadas as medidas da parte aérea principal (cm) e da biomassa fresca (gr).

Após 14 dias da contaminação, 3 vasos de *G. maxima* e *M. spicatum* foram selecionados aleatoriamente e amostrados. As plantas foram lavadas em água corrente e os mesmos parâmetros usados no dia 0 foram aplicados. Foram coletadas ainda amostras de zooplâncton e 1 L de água para determinação das concentrações de clorofila *a* e de nutrientes.

A última amostragem no dia 28 foi realizada seguindo os mesmos procedimentos anteriores. Nesta amostragem, foram medidos os endpoints aplicados no dia 0 e dia 14. As armadilhas de macroinvertebrados foram amostradas, lavadas em água corrente, armazenadas e processadas no mesmo dia, sendo estas contadas e identificadas a nível família e grupo funcional alimentar (Sinderhoeve WUR, 2000).

As medidas de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade foram realizadas nos dias 8 e 14 antes da contaminação, no dia da contaminação e após 1, 7, 14 e 28 dias da contaminação utilizando a sonda multiparâmetro HQ40d multi. Para verificar e acompanhar a variação das concentrações de 2,4-D nos microcosmos, foram realizadas amostragens de água nos dias 3, 8, 14 e 28 após a contaminação.

### **6.5.5 Endpoints avaliados**

#### **6.5.5.1 Macrófitas**

Para a macrófita *G. maxima* os endpoints adotados foram: comprimento total da parte aérea (cm), biomassa fresca e seca das folhas (g) e, biomassa fresca e seca das raízes (g). Para a espécie *M. spicatum* os endpoints medidos foram: parte aérea principal (cm) e a biomassa fresca e seca (g). A biomassa seca das duas macrófitas foram obtidas após 72 horas de secagem a 70°C, seguindo o protocolo estabelecido pelo Centro de pesquisa (Sinderhoeve WUR, 2000).

A porcentagem de inibição de crescimento foi calculada para cada concentração testada (tratamentos) de acordo com a equação 4:

$$\%Ir = \frac{(\mu_c - \mu_t)}{\mu_c} \times 100 \text{ (Eq. 4)}$$

Onde: %Ir: porcentagem média de inibição de crescimento específico;

$\mu_c$ : valor de  $\mu$  no controle e,

$\mu_t$ : valor de  $\mu$  no grupo de tratamento.

### **6.5.5.2 Comunidade de macroinvertebrados e zooplâncton**

Após as coletas, as amostras de macroinvertebrados e de zooplâncton foram processadas. Para os macroinvertebrados, a identificação e contagem foi realizada logo após a coleta, com o auxílio do Manual de identificação do Sinderhoeve (Sinderhoeve WUR, 2000) até nível família. Após as coletas, as amostras de zooplâncton foram preservadas com 5 gotas de lugol (0.5%) e armazenadas para serem processadas posteriormente. Ao final das coletas, as amostras foram processadas e a comunidade zooplanctônica foi identificada a nível espécie e contadas, para a identificação foi utilizado o Manual de identificação do Sinderhoeve (Sinderhoeve WUR, 2000). Com os dados obtidos foram determinados os valores de riqueza e de diversidade, aplicando os índices segundo Shannon (1948).

### **6.5.6 Parâmetros físico-químicos da água**

Os parâmetros físico-químicos da água pH, temperatura e oxigênio dissolvido foram medidos 7 dias antes da contaminação, no dia da contaminação e, 1, 7, 14 e 28 dias após a contaminação, e a condutividade elétrica foi obtida 1, 14 e 28 dias após a contaminação. Todos os dados foram obtidos por meio de instrumentos de medição portáteis multiparâmetros HACH multi HQ40d. A clorofila-a foi determinada 14 e 28 dias após a contaminação. Os parâmetros clorofila *a* (Lorenzen, 1967) e nutrientes amônia, nitrogênio e fósforo (SFA - H<sub>2</sub>O/CaCl<sub>2</sub>, SFA – KCl e SFA - P-Iaag, WUR, 2020) também foram analisados.

### **6.5.7 Análises químicas**

A quantificação dos agrotóxicos foi realizada no laboratório de análises química GLP da Wageningen University & Research, através de Cromatografia Líquida em Espectrometria de Massa (LC-MS/MS) aplicando os métodos explicados por Montagner et al. (2014) e Goulart et al. (2020). O Limite de Quantificação (LOQ) foi obtido conforme Freitas et al., (2019).

### **6.5.8 Análise estatística**

Os dados de todos os parâmetros de teste foram analisados por meio de General Linear Models (GLM) no software R versão 3.6.0 (2009) com a aplicação do R Studio versão 1.2.1335 (2019). As comparações dos tratamentos com o grupo controle e entre os tratamentos foram realizadas com nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ) utilizando Modelos Lineares Generalizados (GLM) (PINTO et al., 2021a, 2021c).

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Experimentos laboratoriais

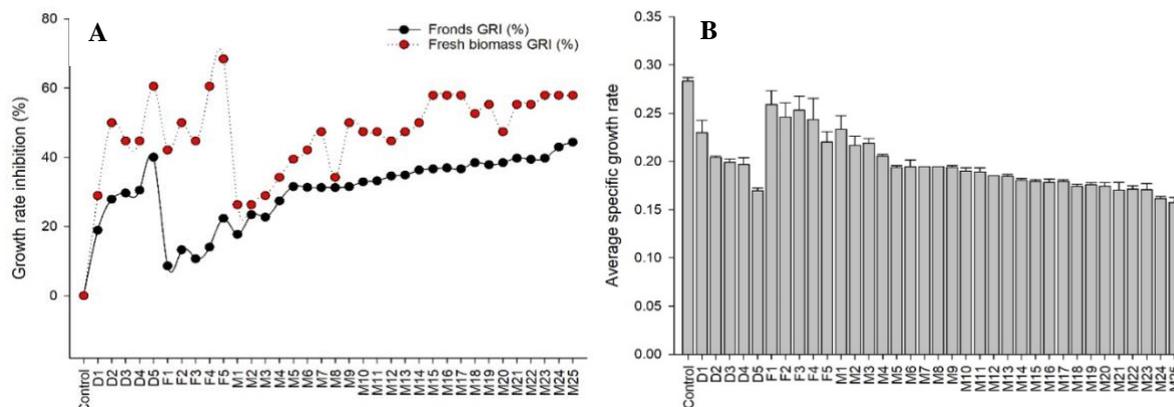
#### 7.1.1 *Landoltia punctata*

Os valores de concentração de efeito ( $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  e  $CE_{10}$ ) de 2,4-D foram calculados para o número de frondes de *L. punctata* e a taxa de inibição de crescimento (%) e taxa de crescimento específico do mesmo (Tabela 2). Como não existem dados sobre a toxicidade de 2,4-D para *L. punctata* na literatura, os resultados foram comparados com outras espécies flutuantes, isto é, a *Lemna minor*: 9.82  $\mu\text{g/L}$  (7.93 - 9.89  $\mu\text{g/L}$ ) (TUNIC' et al., 2015) e a *Lemna trisulca*: >3000  $\mu\text{g/L}$  (BELGERS et al., 2007). Baseando-se nos resultados encontrados na literatura, esperava-se que a *L. punctata* fosse relativamente pouco sensível à exposição ao 2,4-D, uma vez que pertence ao grupo das monocotiledôneas (CLARK; PAZDERNIK, 2016), mas, como demonstrado nos dados abaixo, os efeitos do herbicida 2,4-D já são observados nas menores concentrações testadas. Os valores de  $EC_{50}$  para o fipronil foram calculados, mas estavam abaixo do nível de confiabilidade aceitável ( $p > 0.05$ ), sendo considerados não confiáveis.

**Tabela 2:** Valores de  $EC_{50}$ ,  $EC_{20}$  e  $EC_{10}$  do 2,4-D calculados para a espécie *L. punctata* exposta ao herbicida 2,4-D.

Endpoints	$EC_{50}$	$EC_{20}$	$EC_{10}$
Taxa de inibição de crescimento (%)	5,92 $\mu\text{g/L}$	0,297 $\mu\text{g/L}$	0,051 $\mu\text{g/L}$
	<i>Inferior: 3,88</i>	<i>Inferior: 0,190</i>	<i>Inferior: 0,017</i>
	<i>Superior: 7,95</i>	<i>Superior: 0,404</i>	<i>Superior: 0,085</i>
Taxa de crescimento específico	5,97 $\mu\text{g/L}$	0,305 $\mu\text{g/L}$	0,053 $\mu\text{g/L}$
	<i>Inferior: 3,95</i>	<i>Inferior: 0,198</i>	<i>Inferior: 0,019</i>
	<i>Superior: 0,99</i>	<i>Superior: 0,412</i>	<i>Superior: 0,088</i>
Número de frondes	1,54 $\mu\text{g/L}$	0,065 $\mu\text{g/L}$	Não calculado
	<i>Inferior: 1,18</i>	<i>Inferior: 0,024</i>	
	<i>Superior: 1,90</i>	<i>Superior: 0,106</i>	

Comparando o número de frondes, a taxa de crescimento específico e a inibição de crescimento (%) do grupo controle com as concentrações isoladas e misturas dos agrotóxicos, foram verificados efeitos significativos em todos os tratamentos ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 11). Os maiores efeitos ocorreram nos tratamentos com 2,4-D, mesmo nas concentrações abaixo da  $CE_{50}$  (0,3; 0,6; 0,9 e 1,2 mg i.a./L), quando comparado com os efeitos observados depois da exposição ao fipronil, embora para esta substância também tenham sido registrados efeitos no crescimento (Figura 14).



**Figura 14:** Alterações no número de frondes e biomassa fresca (A) e na inibição da taxa crescimento (B) da espécie *L. Punctata* após exposição ao 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.

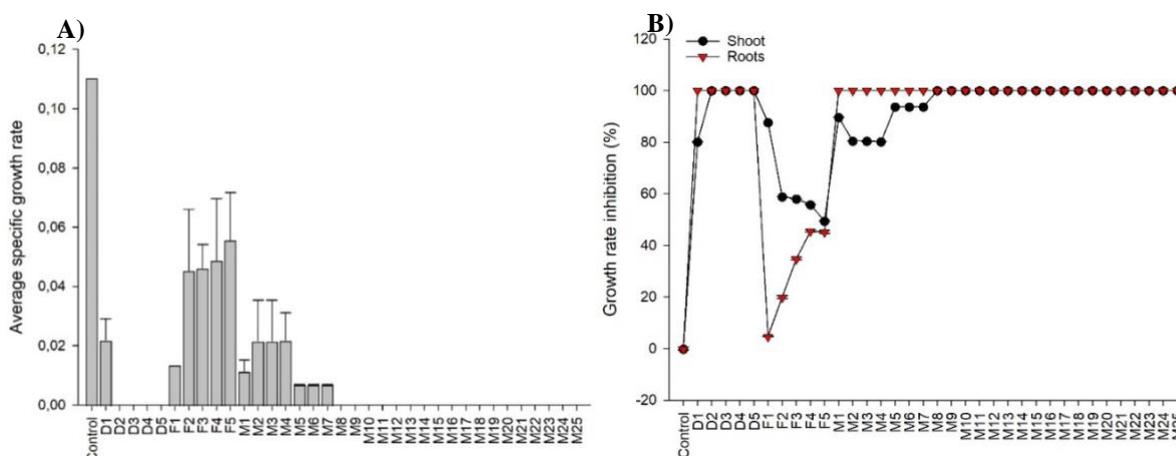
A análise dos tratamentos isolados de 2,4-D (tratamentos D) e fipronil (tratamentos F), em comparação com as misturas (tratamentos M), também mostrou efeitos nos mesmos *endpoints* apresentados anteriormente (Figura 11). Quando os tratamentos D e F isolados são comparados com todos os tratamentos de mistura, apenas nos tratamentos M1; M2; M3; M20; M21 e M22 não foram observados nenhum efeito.

A biomassa fresca, em relação ao grupo controle, diminuiu em todos os tratamentos (D:  $32 \pm 1\%$ ; F:  $27 \pm 2\%$ ; M1 a M5:  $13 \pm 1\%$ ; M6 a M10:  $5 \pm 1\%$ ; M11 a M15:  $11 \pm 1\%$ ; M16 a M20:  $11 \pm 2\%$ , e, M21 a M25:  $3 \pm 1\%$ ), efeito esperado uma vez que o número de frondes e o crescimento também diminuiriam em todas as concentrações dos agrotóxicos testadas.

### 7.1.2 *Myriophyllum aquaticum*

A concentração de efeito ( $CE_{50}$ ) de 2,4-D e fipronil em relação ao comprimento total, taxa de crescimento específico e inibição de crescimento (%) e inibição de crescimento de raízes (%) foram calculadas, mas por não respeitarem a regra de confiabilidade (95% de confiança ( $p \leq 0.05$ )), não serão reportadas aqui. Com base na literatura, os valores de  $CE_{50}$  reportados para 2,4-D por Tunic et al., (2015) são 0.23 mg/L (0.16 - 0.28 mg/L), Ebke et al., (2013)  $> 2$  mg/L e por Turgut & Formin (2002) 0.02 – 0,158 mg/L para a mesma espécie, *M. aquaticum*. Nenhum valor de  $CE_{50}$  foi encontrado na literatura para o inseticida fipronil.

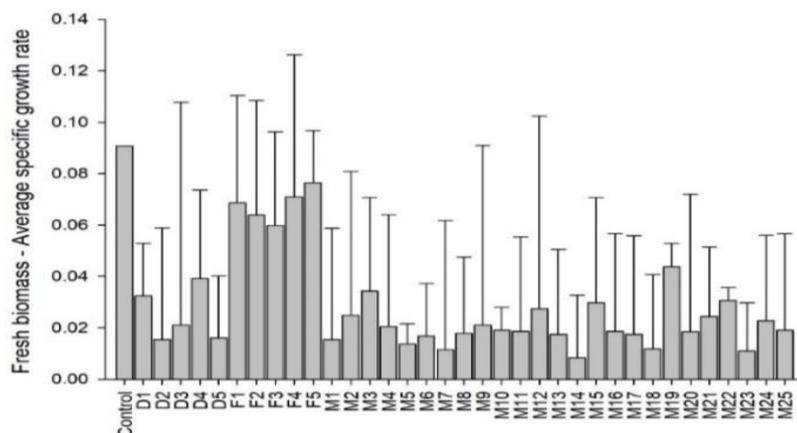
Comparando os resultados de comprimento total, taxa de crescimento específico e inibição de crescimento (%) e inibição de crescimento de raízes (%) com o grupo controle e com as concentrações de agrotóxicos isoladas e em misturas, em todos os tratamentos foram observados efeitos significativos ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 15). No comprimento total o maior valor reportado foi de 11 cm em D1; 14.83 cm em F4 e 11.65 cm em M1. Os crescimentos das raízes foram somente observados nos tratamentos Controle e F, ou seja, em todas as concentrações de D testadas verificou-se uma inibição de 100% de crescimento nas raízes e nos caules.



**Figura 15:** Respostas de crescimento e inibição de crescimento da macrófita *M. aquaticum* após exposição ao 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.

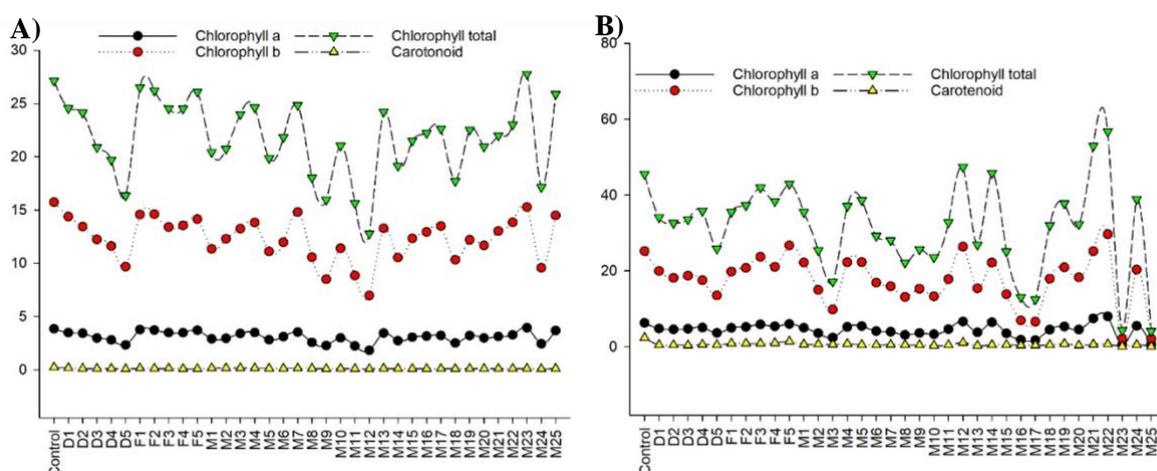
A análise do comprimento total dos caules nos tratamentos isolados de 2,4-D (D) e fipronil (F), em comparação com as misturas, também mostrou efeitos em quase todos os tratamentos, exceto M7; M9 e M10. Em relação à taxa de crescimento específico, apenas M6 e M7 apresentaram efeitos significativos em relação aos demais tratamentos, sendo que no crescimento das raízes os efeitos de inibição foram observados somente em M15 e M20.

A biomassa fresca média (Figura 16), em comparação com o grupo controle, diminuiu em D:  $39 \pm 1\%$ ; F:  $60 \pm 2\%$ ; M1 a M5:  $76 \pm 3\%$ ; M6 a M10:  $16 \pm 1\%$ ; M11 a M15:  $12 \pm 1\%$ ; M16 a M20:  $46 \pm 2\%$ , e, M21 a M25:  $33 \pm 1\%$ , um efeito esperado uma vez que o crescimento diminuiu em todas as concentrações, exceto na testemunha.



**Figura 16:** Biomassa fresca da macrófita *M. aquaticum* após exposição ao 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura

Os resultados obtidos para o teor de pigmentos fotossintéticos mostraram uma diminuição da clorofila *a* *b* e *total* principalmente nas concentrações isoladas de 2,4-D e nas Misturas em relação ao controle. Esses efeitos são perceptíveis desde a menor concentração de 2,4-D (0.3 mg/L) e são observados em todas as concentrações para as duas espécies de macrófitas testadas, indicando inibição da fotossíntese, com bloqueio da cadeia de transporte de elétrons e alteração nas condições de crescimento da planta (KHAN et al., 2019; WONG, 2000). O teor de carotenoide seguiu a tendência dos valores de clorofila, mas de forma menos expressiva.



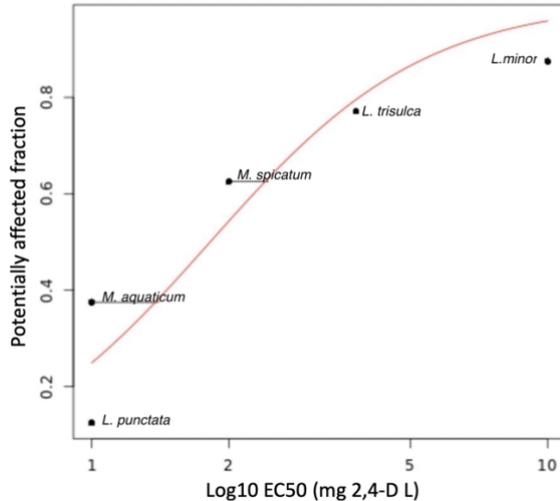
**Figura 17:** Valores de clorofila *a*, *b* e *total* e carotenoide ( $\mu\text{g/L}$ ) para *L. punctata* (A) e *M. aquaticum* (B) após exposição ao 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.

Nesta etapa foi possível observar alguns pontos, sendo eles em relação a *L. punctata*: a menor concentração testada de 2,4-D, 0.3 mg/L onde os efeitos já são observados, é correspondentemente 61 vezes maior os valores calculados das CE<sub>50</sub> para inibição de crescimento 5.92 µg/L (3.88 – 7.95 µg/L) e taxa de crescimento 5.97 µg/L (3.95 – 7.99 µg/L) e, 237 vezes maior que a CE<sub>50</sub> do *endpoint* número de frondes 1.54 µg/L (1.18 – 1.90 µg/L). Assim, os valores de 2,4-D em corpos d'água no estado de São Paulo reportados no relatório da CETESB (2018) já apresenta um alto risco à espécie de macrófita *L. punctata*.

Seguindo a discussão levantada por Daam e Van den Brink et al., (2010) acerca da comparação em relação a sensibilidade e resposta à exposição de agrotóxicos em espécies de clima tropical e temperado, quando comparados os resultados obtidos na *L. punctata* com outras espécies flutuantes de clima temperado, a *Lemna minor* 9.82 µg/L (7.93 - 9.89 µg/L) (TUNIC et al., 2015) e *Lemna trisulca* >3000 µg/L (BELGERS et al., 2007) a espécie tropical se apresenta mais sensível à exposição ao agrotóxico.

Para o *M. aquaticum*, onde na menor concentração de 2,4-D efeitos também foram observados, não foi possível calcular os EC<sub>50</sub> para os *endpoints* propostos, mas com base na literatura, os valores de CE<sub>50</sub> reportados para 2,4-D por Tunic et al., (2015) foi de 0.23 mg/L (0.16 - 0.28 mg/L), e por Turgut & Formin (2002) 0.02 – 0,158 mg/L para a mesma espécie, *M. aquaticum* é possível observar que, novamente os valores de 2,4-D disponíveis em d'água no estado de São Paulo podem afetar o crescimento, reprodução e desenvolvimento da espécie.

Com os dados obtidos na literatura disponível e suplementada pelos dados contidos na base de dados da Environmental Protection Agency dos Estados Unidos da América (US-EPA 2022), foi elaborada uma curva de distribuição de sensibilidade (SSD) onde pode-se visualizar e reforçar a sensibilidade das espécies tropicais de macrófitas aquáticas, *L. punctata* e *M. aquaticum*, conforme os dados obtidos e apresentados na presente tese.



**Figura 18:** Curva de distribuição de sensibilidade (SSD) das espécies de macrófitas aquáticas expostas ao herbicida 2,4-D de acordo com a base de dados da EPA-EUA (US-EPA 2022).

## 7.2 Modelos ecossistêmicos em clima tropical (Itirapina, Brasil)

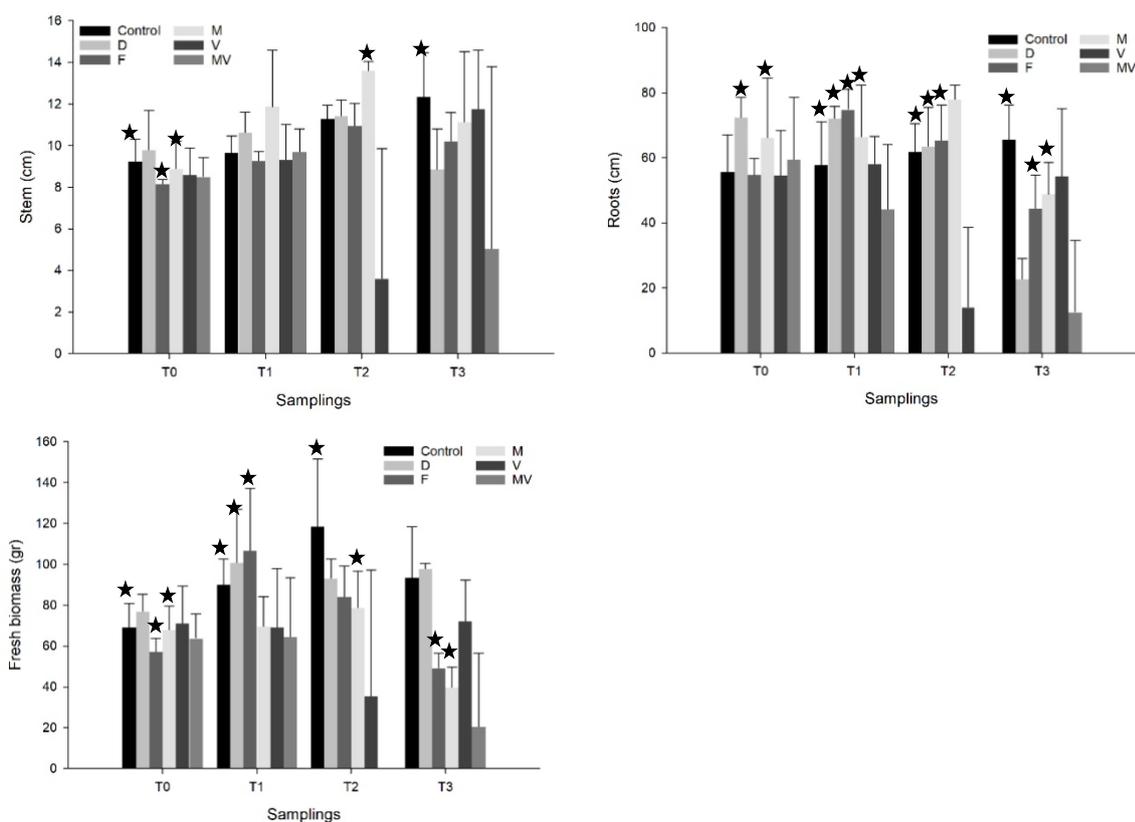
### 7.2.1 *Eichhornia crassipes*

Como explicado anteriormente, foram adicionados exemplares de *E. crassipes* durante a montagem dos mesocosmos, e após um período de 6 meses de aclimação a comunidade de macrófitas aquáticas foi estabelecida, bem como a comunidade de macroinvertebrados associada. Desta forma, para essa espécie em específico, foram analisados os efeitos da adição dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, em ambas as comunidades. Neste cenário, quatro amostragens foram realizadas, sendo elas em  $t_0$  (dois dias antes da contaminação) e em  $t_1$ : 7,  $t_2$ : 30 e  $t_3$ : 75 dias após a contaminação. Em cada amostragem foram retirados três indivíduos de *E. crassipes* para análise dos efeitos dos contaminantes. Três *endpoints* foram utilizados para mensurar os efeitos dos contaminantes na macrófita *E. crassipes*: tamanho do caule (cm), tamanho das raízes (cm) e a biomassa fresca (g) (Figura 15). A análise dos resultados foi realizada considerando dois cenários: todos os tratamentos entre a mesma amostragem/tempo e a amostragem/tempo versus  $t_0$  (Figura 18).

Comparando os resultados obtidos no grupo controle (C) com os demais tratamentos, no tempo  $t_1$  (7 dias após a contaminação) verificou-se que apenas nos

tratamentos F e V, o caule das plantas cresceram abaixo dos valores observados em C, e em todos os demais tratamentos D, M e MV a taxa de crescimento reportada foi superior ao grupo controle, 10%; 23% e 0.64%, respectivamente (Figura 19). Em  $t_2$  (31 dias após a contaminação), o mesmo resultado no crescimento dos caules foi relatado. As macrófitas nos tratamentos com fipronil (F) e vinhaça (V) isolados cresceram menos em relação ao tratamento C, enquanto em D (1.3%) e M (20%) os crescimentos foram acima do C. No  $t_2$  do tratamento MV, todas as plantas morreram. Por fim, em  $t_3$  (73 dias após a contaminação), em todos os tratamentos a taxa de crescimento ficou abaixo de C, excluindo o MV onde houve recuperação das plantas e até crescimento de 23% acima de C (Figura 18).

No  $t_0$ , a média do caule em todos os tratamentos foi de 8,9 cm. Comparando o tamanho médio do caule nas várias amostragens, as maiores taxas de crescimento foram relatadas no  $t_1$ : F ( $14 \pm 1\%$ ), M ( $34 \pm 1\%$ ) e MV ( $14 \pm 12$ ),  $t_2$ : F ( $34 \pm 1\%$ ), M ( $53 \pm 1\%$ ) e V ( $26 \pm 1\%$ ) e  $t_3$ : C (33 %), M ( $37 \pm 1\%$ ) e V ( $78 \pm 1\%$ ). Quando os tratamentos foram comparados dentro do mesmo dia de amostragem, não foi relatada significância estatística ( $p \geq 0.05$ ). Porém, quando os tratamentos são comparados entre as amostragens, C em  $t_0$  ( $p \leq 0.024$ ) e M em  $t_0$  ( $p \leq 0.045$ ) foram significativamente diferentes de  $Mt_2$ ,  $Ft_0$  ( $p \leq 0.006$ ) e  $Ct_3$  ( $p \leq 0.037$ ).



**Figura 19:** Valores de comprimento do caule (cm), raízes (cm) e biomassa fresca (g) obtidos para a espécie *E. crassipes* após exposição aos tratamentos C (controle), D (2,4-D), F (fipronil), M (mistura de 2,4-D e fipronil), V (vinhaça) e MV (mistura de vinhaça, 2,4-D e fipronil) em diferentes períodos de amostragem (T).

Para o tamanho médio das raízes, em  $t1$ , apenas no tratamento MV verificou-se crescimento menor em comparação com C (24%), sendo que os maiores valores foram relatados em F (29%) e D (25%). Em  $t2$ , no tratamento M foi obtida a maior taxa de crescimento de raízes (26%), seguido de F e D (6 e 3%, respectivamente), enquanto no tratamento V o crescimento das raízes foi inferior ao controle ©. No tratamento MV todas as plantas morreram após exposição à mistura de vinhaça com os agrotóxicos. No entanto, em  $t3$  verificou-se que em todos os tratamentos a taxa de crescimento das raízes foi inferior a controle (C). Nos tratamentos D e MV foram obtidas as menores taxas de crescimento (65 e 42%, respectivamente) em relação ao controle (C).

Comparando os resultados do tamanho médio das raízes em todas as amostragens com as medidas iniciais ( $t0$ : 60,6 cm), verifica-se que em  $t1$  a taxa de crescimento das raízes foi acima de C apenas nos tratamentos F (36,59%), M (0,35%) e V (6,33%). Em  $t2$ , apenas nos tratamentos F (17,65%) e M (19,36%) registrou-se

crescimento maior do que em  $t_0$ . Em  $t_3$ , em nenhum dos tratamentos verificou-se crescimento maior que o obtido no controle (C). Diferenças estatísticas mostrando crescimento inferior foram relatadas apenas em  $Ct1$  ( $p \leq 0,003$ ),  $Ct2$  ( $p \leq 0,0009$ ),  $Ct3$  ( $p \leq 0,018$ ),  $Dt0$  ( $p \leq 0,0002$ ),  $Dt1$  ( $p \leq 0,0002$ ),  $Dt2$  ( $p \leq 0,002$ ),  $Ft1$  ( $p \leq 0,0001$ ),  $Ft2$  ( $p \leq 0,001$ ),  $Mt0$  ( $p \leq 0,0009$ ),  $Mt1$  ( $p \leq 0,0009$ ) e  $Mt3$  ( $p \leq 0,0001$ ) em relação à  $Dt2$ . Os resultados obtidos em  $Ft1$  ( $p \leq 0,054$ ) e  $Mt2$  ( $p \leq 0,025$ ) foram diferentes de  $Ft3$ .

Para os resultados da biomassa fresca, verificou-se que em  $t1$  ocorreu redução em M (23%), V (23%) e MV (28%), com aumento em F e D (18 e 12%, respectivamente). Em  $t2$  a biomassa fresca diminuiu em todos os tratamentos e em MV as plantas estavam mortas (Figura 19). Os mesmos efeitos relatados em  $t2$  foram observados em  $t3$ , exceto para o tratamento D, no qual foi registrado um aumento de 5% da biomassa fresca em relação ao controle.



**Figura 20:** Efeito da adição da mistura da vinhaça com fipronil e 2,4-D na sobrevivência das macrófitas aquáticas no tratamento MV nos tempos  $t_0$  (antes da adição) e  $t_2$  (após adição).  
Fonte: Autora, 2019

Comparando os tratamentos entre as amostragens, em todos os mesocosmos controle ( $t1$ ,  $t2$  e  $t3$ ) a biomassa fresca aumentou, assim como nos tratamentos D ( $t1$ : 31%;  $t2$ : 21% e,  $t3$ : 27%). O maior aumento foi observado em F (86%) em  $t1$ . Na amostragem  $t2$  todos os valores de biomassa fresca obtidos ficaram acima dos obtidos no tratamento C. Mesmo com a recuperação em  $t3$ , no tratamento MV não houve aumento da biomassa fresca em mais de 1% em relação a  $Ct0$ . As análises estáticas mostraram que  $Ct0$  é diferente de  $Ct2$  ( $p \leq 0,013$ ),  $Ct1$  é diferente de  $Mt3$  ( $p \leq 0,039$ ) e  $Ct2$  é diferente de  $Ft0$

( $p \leq 0.004$ ), Ft3 ( $p \leq 0.0008$ ), Mt0 ( $p \leq 0.037$ ) e Mt3 ( $p \leq 0.0002$ ). O tratamento Dt1 é diferente de Mt3 ( $p \leq 0.016$ ) e Ft1 é diferente de Ft3 ( $p \leq 0.038$ ) e Mt3 ( $p \leq 0.005$ ).

Sperry e Ferrel (2021) testaram três diferentes concentrações de 2,4-D, glifosato e diquat para o controle do crescimento de *E. crassipes*, e os autores verificaram que na menor concentração (187 L ha), a biomassa reduziu 99% após 7 dias da exposição. Kumar et al., (2019) também testaram o efeito de quatro concentrações de 2,4-D (1, 2, 4 e 6 mg/L) no crescimento de *E. crassipes*, e, após 6 dias observaram que nos tratamentos de 2 e 4 mg/L as plantas começaram a murchar, enquanto nos tratamentos de 6 mg/L, após 9 dias de exposição, todas as plantas morreram. Quando Madsen e Kyser (2020) testaram duas concentrações de 2,4-D (2.130 e 1.065 g i.a ha) houve uma diminuição de 82% e 49% na biomassa fresca das macrófitas, respectivamente.

Avaliando os dados obtidos no presente experimento com os estudos mencionados anteriormente, os efeitos observados em *E. crassipes* eram esperados e mostram que a dose recomendada de 2,4-D (considerando a aplicação na cana-de-açúcar) poderia realmente afetar o processo fisiológico básico das macrófitas, interferindo, conseqüentemente, na biomassa. Uma possível explicação para os resultados obtidos seria o fato de que o herbicida 2,4-D interrompe a resposta hormonal da planta, afetando a via metabólica, interferindo no crescimento, desenvolvimento e até mesmo na morte das plantas (DATTA; KUMAR, 2012; MADSEN; KYSER, 2020). Esses efeitos foram observados não apenas nos tratamentos isolados de 2,4-D, mas também na mistura dos pesticidas (2,4-D e fipronil) e na mistura dos pesticidas com vinhaça. A alta disponibilidade de nutrientes e menores as concentrações de oxigênio dissolvido no mesocosmos tratados com vinhaça colaboraram diretamente com a morte das plantas (PINTO et al., 2021a).

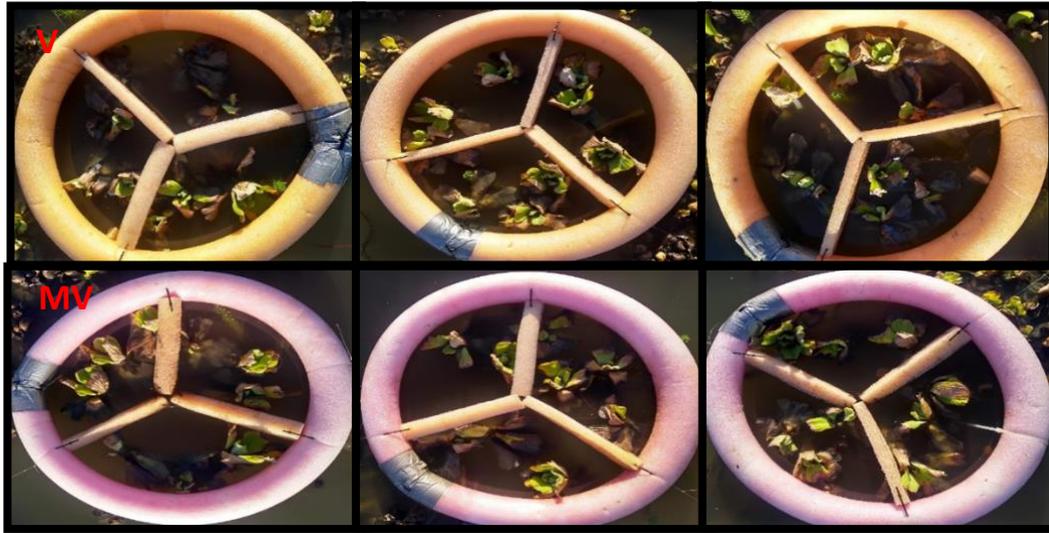
### 7.2.2 *Pistia stratiotes*

Analisando os resultados obtidos na primeira amostragem (t1 – 7 dias após a contaminação) observa-se que o crescimento do caule no tratamento mistura (M) foi o maior valor reportado (6.97 cm), seguido pelo controle (6.18 cm), 2,4-D isolado (6.16 cm) e fipronil isolado (5.75 cm), conforme apresentado nas figuras 19 e 20. Em contrapartida, os menores valores reportados ocorreram nos tratamentos com as misturas

dos agrotóxicos com a vinhaça (MV) e na vinhaça isoladamente (V), com valores de caule de 2.93 cm e 3.07 cm, respectivamente (Figura 21).

Na amostragem  $t_2$  (31 dias após a contaminação), verificou-se que nos tratamentos V e MV (vinhaça isolada ou em mistura com os agrotóxicos) todas as plantas morreram. Novamente foi observado o maior valor de crescimento do caule no tratamento M:  $8.76 \pm 1$  cm, seguido pelo F:  $7.35 \pm 1$  cm e D:  $6.8 \pm 1$  cm. Nesta coleta, o menor valor observado foi no controle ( $6.45 \pm 1$  cm), o que pode estar relacionado com possíveis efeitos do inseticida fipronil sobre espécies de invertebrados que poderiam interferir no crescimento das plantas, como também relatado por Daam et al., (2010) e Van den Brink et al., (2000), onde os maiores valores de crescimento e biomassa da macrófita *Elodea nuttallii* foram reportados nos tratamentos com o fungicida carbendazim.

Na última amostragem ( $t_3$ ), verificou-se que o crescimento das plantas presentes no tratamento M foi o mais elevado ( $7.36 \pm 1$  cm). Diferente do que foi reportado na amostragem anterior, no controle verificou-se um crescimento das plantas de  $5.73 \pm 1$  cm, seguido pelas plantas do tratamento D:  $4.36 \pm 1$  e F:  $4.4 \pm 1$  cm. Após 43 dias, nos tratamentos V ( $4.1 \pm 1$  cm) e MV ( $5 \pm 1$  cm) houve recuperação e crescimento das macrófitas. Quando os tratamentos foram comparados dentro das mesmas amostragens, diferenças estatísticas não foram reportadas. Porém, quando são feitas comparações entre os tratamentos no mesmo dia de amostragem, apenas o tratamento da mistura com vinhaça (MV) no  $t_2$  é diferente dos tratamentos Dt3 ( $p \leq 0.004$ ) e Ft3 ( $p \leq 0.005$ ) (Figura 20).



**Figura 21:** Efeitos da adição da vinhaça (V) e da mistura de vinhaça com os agrotóxicos (MV) na sobrevivência e crescimento das macrófitas após 7 dias de contaminação.  
Fonte: Autora, 2022

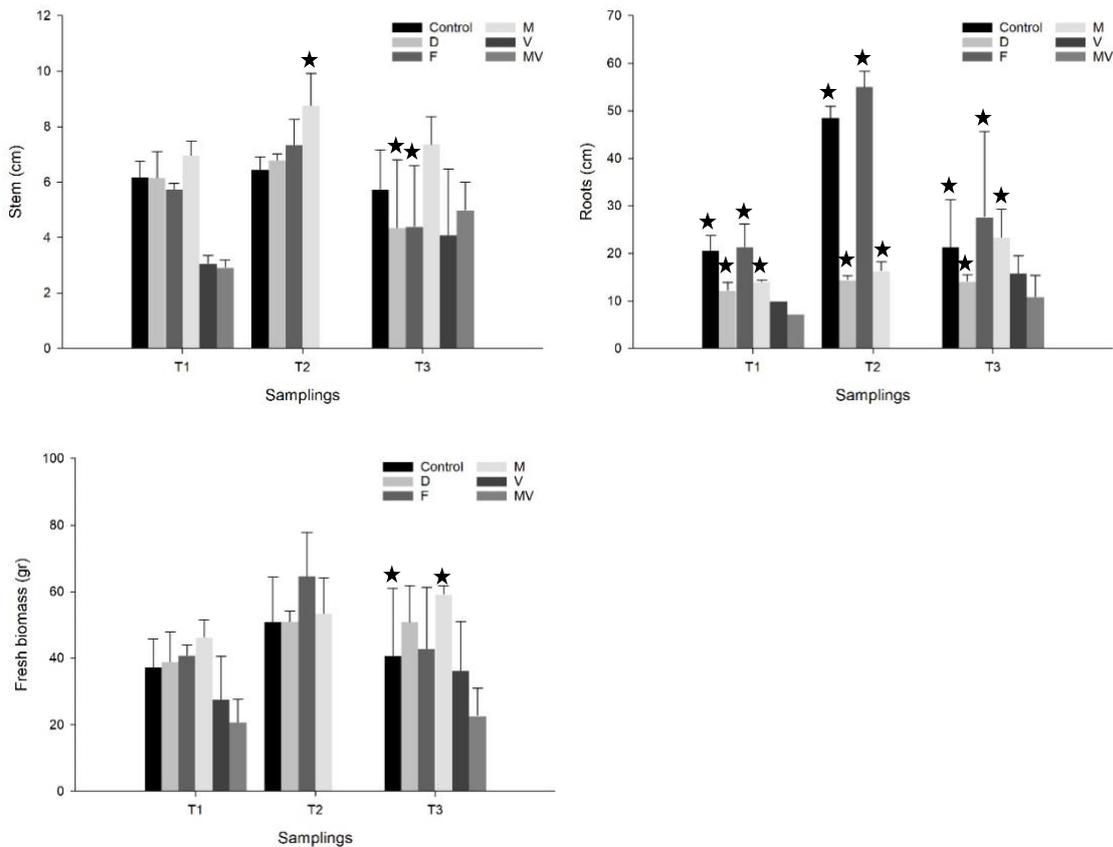
Em relação ao crescimento médio das raízes durante o experimento, na amostragem *t1* os maiores valores reportados ocorreram no controle ( $20.67 \pm 1$  cm), em F ( $21.38 \pm 1$  cm) e em M ( $14.11 \pm 1$  cm), enquanto os menores valores foram observados em D:  $12.27 \pm 1$  cm, V:  $6.66 \pm 1$  cm e MV:  $2.44 \pm 1$  cm. Na amostragem *t2* as raízes cresceram  $55 \pm 1$  cm no tratamento F,  $48.56 \pm 1$  cm no controle,  $16.33 \pm 1$  na mistura e  $14.5 \pm 1$  cm em D, sendo este o menor valor reportado na amostragem. Conforme citado acima, nos tratamentos V e MV as plantas estavam mortas após 7 dias de contaminação.

Na amostragem *t3* os maiores valores de crescimento de raízes foram observados em F ( $27.7 \pm 2$  cm), M ( $23.41 \pm 1$  cm) e no controle ( $21.43 \pm 2$  cm), sendo que os menores valores ocorreram nos tratamentos V ( $15.88 \pm 1$  cm), D ( $14.16 \pm 1$  cm) e MV ( $10.88 \pm 1$  cm). Estatisticamente, não houve diferença entre os tratamentos no mesmo dia de amostragem, mas entre todos os tratamentos de todas as amostragens foram observadas diferenças significativas quando comparado *Ct1* e *Ct2* ( $p \leq 0.004$ ) e *Ct1* e *Ft2* ( $p \leq 0.0001$ ). A amostragem *t2* foi a que apresentou maior diferença estatística quando comparada com todos os tratamentos de todas as amostragens, sendo diferente de *Ct3* ( $p \leq 0.0005$ ), *Dt1* ( $p \leq 0.0006$ ), *Dt2* ( $p \leq 0.0001$ ), *Dt3* ( $p \leq 0.0004$ ), *Ft1* ( $p \leq 0.0001$ ), *Ft3* ( $p \leq 0.01$ ), *Mt1* ( $p \leq 0.0001$ ), *Mt2* ( $p \leq 0.001$ ) e *Mt3* ( $p \leq 0.001$ ).

Quanto à biomassa das macrófitas no  $t1$ , no tratamento da mistura (M) o valor reportado foi de 40.88 g, sendo este maior que o controle (com  $37 \pm 1$  g), D ( $39 \pm 1$  g) e F ( $41 \pm 1$  g). Os menores valores foram observados nos tratamentos com a presença da vinhaça (V e MV:  $28 \pm 1$  g e  $21 \pm 1$  g, respectivamente). Na segunda amostragem,  $t2$  (31 dias após a contaminação), no tratamento com o inseticida fipronil (F) obteve-se o maior valor de biomassa ( $65 \pm 1$  g), seguido pelo tratamento das misturas M:  $54 \pm 1$  g, herbicida (D):  $51 \pm 1$  g e do controle (C):  $51 \pm 1$  g. Para os tratamentos com vinhaça (V e MV) não há valores a serem reportados, uma vez que as plantas estavam mortas nos tratamentos citados.

Na amostragem  $t3$ , a biomassa fresca média no tratamento da mistura (M) foi novamente, assim como na coleta  $t1$ , o maior valor observado ( $59 \pm 1$  g). No tratamento D o valor reportado foi de  $51 \pm 1$  g, seguido por F ( $43 \pm 1$  g) e controle ( $41 \pm 1$  g). Como explicado anteriormente, houve recuperação nos tratamentos com vinhaça V e MV, obtendo-se valores de biomassa de  $36 \pm 1$  g e  $23 \pm 1$  g no final do experimento, respectivamente. Quando comparados os tratamentos na mesma amostragem, significâncias estatísticas foram observadas e são destacados abaixo (Figura 20) e quando todos os tratamentos foram comparados entre todas as amostragens, apenas o tratamento  $Mt3$  foi estatisticamente diferente do tratamento  $Ct3$  ( $p \leq 0.007$ ).

São escassos os estudos de toxicidade conduzidos com a macrófita aquática *P. stratiotes* e os contaminantes 2,4-D, fipronil e vinhaça. Quando testado para o controle da *P. stratiotes* em caixas d'água, o herbicida 2,4-D na concentração de 1.340 g ha mostrou efeito de controle eficiente após 20 dias de aplicação (MARTINS et al., 2002). Em outro estudo desenvolvido por Datta & Mahapatra (2015) foram testadas duas concentrações do herbicida 2,4-D (5 e 10 kg ha) em laboratório e após 11 dias foi observado controle total das macrófitas na menor dose (5 kg ha).



**Figura 22:** Valores de comprimento do caule (cm), raízes (cm) e biomassa fresca (g) obtidos para a espécie *Pistia stratiotes* após exposição aos tratamentos C (controle), D (2,4-D), F (fipronil), M (mistura de 2,4-D e fipronil), V (vinhaça) e MV (mistura de vinhaça, 2,4-D e fipronil) em diferentes períodos de amostragem ( $t1$ ,  $t2$  e  $t3$ )

### 7.2.3 Nutrientes nas macrófitas aquáticas

As concentrações de carbono total, nitrogênio total e fósforo total foram quantificadas nas macrófitas após cada período de coleta. Em relação a *P. stratiotes*, verifica-se que as concentrações médias de carbono total nos tratamentos controle (C) foi de  $34 \pm 2$  mg/kg, em D:  $35 \pm 2$  mg/kg, F:  $39 \pm 2$  mg/kg, mistura (M):  $36 \pm 1$  mg/kg (Figura 22).

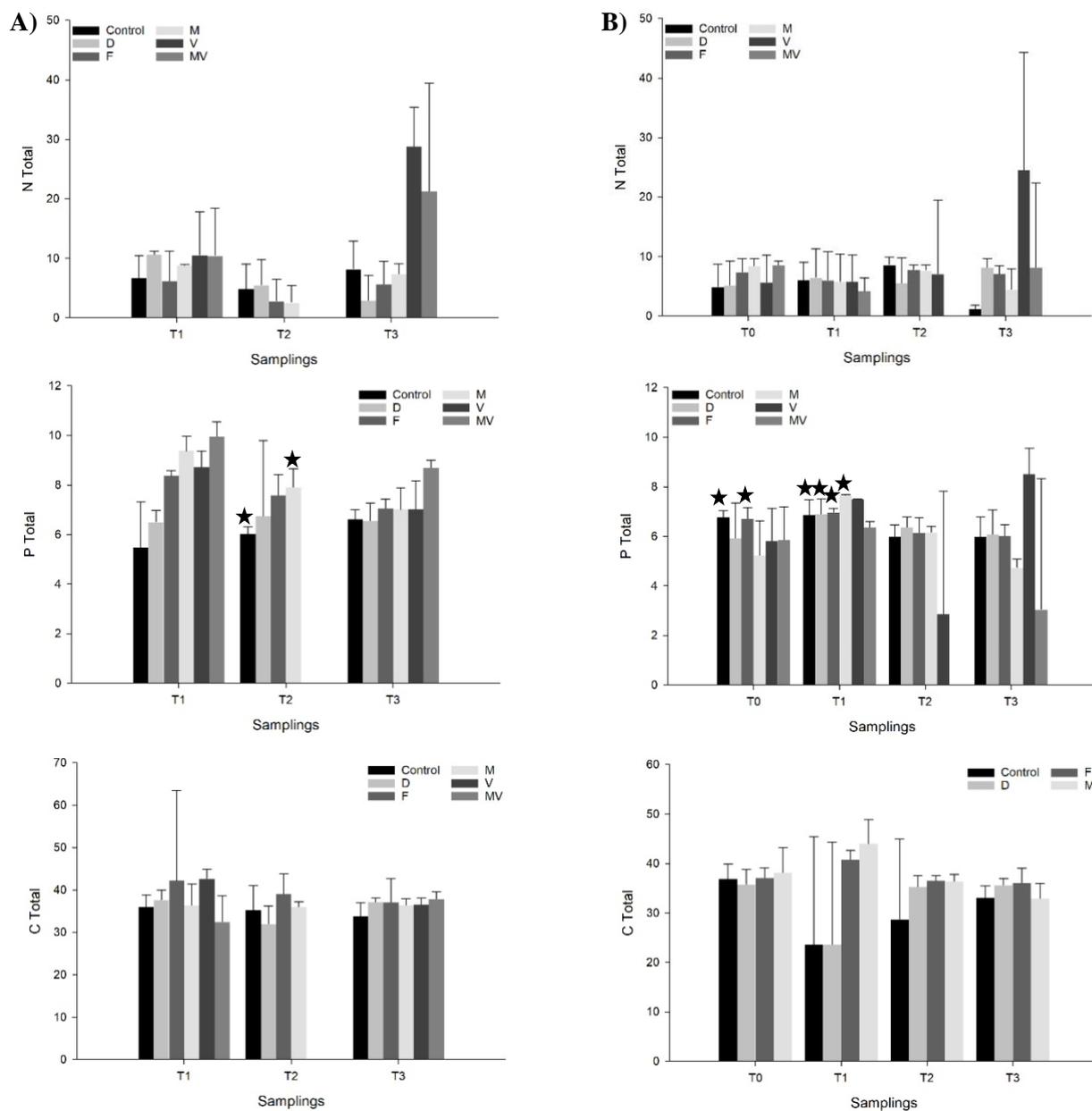
Para nitrogênio total, as concentrações no tratamento controle foram de  $6 \pm 2\%$ , em D:  $6 \pm 4\%$ , em F:  $5 \pm 2\%$  e em M:  $6 \pm 2\%$ . Nos tratamentos com a presença da vinhaça (V e MV) os valores reportados na amostragem  $t2$  eram o dobro do reportado no  $t1$  ( $10 \pm 1\%$ ). Assim como os valores de C e N descritos acima, o teor de fósforo total nas

amostragens se mantiveram em faixas próximas ao controle  $5\pm 2$   $\mu\text{g/g}$ , sendo que nos demais tratamentos os valores foram de: D ( $6\pm 1$   $\mu\text{g/g}$ ), F ( $7\pm 1$   $\mu\text{g/g}$ ) e M ( $7\pm 2$   $\mu\text{g/g}$ ). Mesmo nos tratamentos com vinhaça (V e MV) os valores de nitrogênio foram próximos aos demais tratamentos ( $8\pm 1$   $\mu\text{g/g}$ ). Diferenças estatísticas somente foram encontradas para P total quando comparado com todos os tratamentos, onde *Ct1* se mostrou diferente de *Mt2* ( $p\leq 0.032$ ).

Para a macrófita *E. crassipes* foram quantificados valores semelhantes ao da *P. stratiotes*. Para o carbono total, no controle (C) a média entre a amostragem foi de  $30\pm 6$  g/kg, enquanto nos tratamentos D F e M os valores obtidos foram de  $32\pm 4$ ;  $37\pm 4$  e  $37\pm 6$  mg/kg. Para os tratamentos com vinhaça (V e MV) os valores quantificados seguiram os demais tratamentos ( $37\pm 6$  mg/kg e  $21\pm 6$  mg/kg, respectivamente).

Os valores de nitrogênio quantificados no controle (C) foram de  $5\pm 2\%$ , enquanto em D, F, M, V e MV foram de  $6\pm 2\%$ ,  $7\pm 1\%$ ,  $6\pm 2\%$ ,  $10\pm 1\%$ ,  $5\pm 3\%$ , respectivamente. Os valores de P total obtidos no controle, D e F foram semelhantes ( $6\pm 1$   $\mu\text{g/g}$ ), enquanto em M, V e MV foram de  $5\pm 1$   $\mu\text{g/g}$ ,  $6\pm 1$   $\mu\text{g/g}$  e  $3\pm 3$   $\mu\text{g/g}$ , respectivamente. Apenas para P total foi observada significância estatística ao comparar todos os tratamentos em todas as amostragens, como no caso do tratamento M (mistura) em *t3* quando comparada com *Ct0* ( $p\leq 0.012$ ), *Ct1* ( $p\leq 0.007$ ), *Dt1* ( $p\leq 0.0212$ ), *Ft0* ( $p\leq 0.0538$ ), *Ft1* ( $p\leq 0.0147$ ) e *Mt1* ( $p\leq 0.0006$ ).

Visto que as plantas aquáticas desempenham um papel fundamental no funcionamento dos ecossistemas de água doce (CESCHIN; BELLINI; SCALICI, 2021; GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011), algumas espécies possuem elevada capacidade em assimilar e estocar nutrientes, além de contribuir com altas taxas de produção primária. Como demonstrado nos resultados acima descritos, os valores de C, N e P, mesmo na presença dos contaminantes, foram similares aos previamente registrados (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2008, 2006), sendo assim considerados aceitáveis, não indicando efeitos decorrentes no processo de absorção de nutrientes no decorrer do tempo em nenhum tratamento quando comparado ao controle experimental.



**Figura 23:** Valores de N total, P total e C total quantificados em *P. stratiotes* (A) e em *E. crassipes* (B) nos diferentes tratamentos e períodos de amostragem. (Obs.: \* representam diferenças estatísticas entre os tratamentos)

#### 7.2.4 Fauna de macroinvertebrados associados às macrófitas aquáticas.

O total de 12.954 indivíduos de macroinvertebrados foram coletados, contados e identificados durante as três amostragens realizadas com a macrófita *P. stratiotes* (Tabela 3). Da macrofauna identificada, a maior incidência foi de Oligochaeta, que são coletores-catadores, seguido pelas famílias Planorbidae e Lymnaeidae (raspadores),

Orthoclaadiinae e Chironomidae (coletores-catadores), Veliidae (predadores) e Libellulidae (predadores). Estas famílias são conhecidas por serem tolerantes (Odonata, Hemíptera e Coleoptera) e resistentes (Oligochaeta e Díptera) a ambientes perturbados. Cabe ressaltar a ausência da macrofauna nos tratamentos com vinhaça (V e MV).

Para a macrófita *E. crassipes*, um total de 45.701 indivíduos de macroinvertebrados foram amostrados e identificados (Tabela 4) em dez ordens (Anfípoda, Coleóptera, Díptera, Ephemeroptera, Gastropoda, Hemiptera, Odonata, Oligochaeta, Plecoptera e Trichoptera), foram mais dominantes: Oligochaeta, Orthoclaadiinae e Chironomidae (coletores-catadores), Planorbidae e Lymnaeidae (raspadores), Mesoveliidae e Veliidae (predadores) e Libellulidae e Lestidae (predadores).

**Tabela 3:** Composição, densidade e grupo alimentar de macroinvertebrados presentes nas raízes de *P. stratiotes* durante período experimental nos tratamentos Controle (C), 2,4-D (D), Fipronil (F) e M (mistura de 2,4-D e fipronil) nos tempos *t1*, *t2* e *t3*

Ordem	Família/ Tribo	GA	<i>t1</i>				<i>t2</i>				<i>t3</i>			
			C	D	F	M	C	D	F	M	C	D	F	M
<b>Coleoptera</b>														
	<i>Dryopidae</i>	T	1	-	-	-	3	1	-	-	-	1	-	-
	<i>Dysticidae</i>	P	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	
	<i>Elmidae</i>	R	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	
	<i>Hydrophilidae</i>	CC	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	
	<i>Hydrophilidae larvae</i>	CC	2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
<b>Díptera</b>														
	<i>Chironomidae</i>	CC	1	1	-	-	4	1	-	-	1	-	-	
	<i>Culicidae</i>	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Ephydriidae larvae</i>	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Orthoclaadiinae</i>	CC	3	2	-	-	6	1	-	-	13	-		
	<i>Pupa</i>	CC	1	2	-	-	1	-	-	-	-	-		
	<i>Syrphidae</i>	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<b>Gastropoda</b>														
	<i>Lymnaeidae</i>	R	2	1	3	-	4	6	34	21	8	7	24	23
	<i>Planorbidae</i>	R	51	25	188	168	481	161	321	130	425	147	112	572
<b>Hemiptera</b>														
	<i>Belostomatidae</i>	P	-	1	-	-	-	4	-	-	-	-	-	
	<i>Corixidae</i>	P	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Mesoveliidae</i>	P	-	-	1	-	5	-	-	3	2	2	1	
	<i>Naucoriidae</i>	P	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-		
	<i>Pleidae</i>	P	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-		
	<i>Veliidae</i>	P	5	2	6	1	7	7	4	14	1	-	1	1
<b>Odonata</b>														
	<i>Aeshnidae</i>	P	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	
	<i>Lestidae</i>	P	5	3	-	-	3	3	-	-	3	3	-	
	<i>Libellulidae</i>	P	54	10	-	-	53	18	-	-	85	112	-	
<b>Oligochaeta</b>														
		CC	472	343	502	488	1034	828	692	821	2238	1074	245	820
	<b>Total</b>		603	391	701	657	1603	1033	1051	990	2779	1346	383	1417

**Legenda:** GA: grupo alimentar, T: triturador; P: predador; R: raspador; CC: coletor-catador

**Tabela 4:** Composição, densidade e grupo alimentar de macroinvertebrados presentes nas raízes de *E. crassipes* durante período experimental nos tratamentos Controle (C), 2,4-D (D), Fipronil (F), M (mistura de 2,4-D e fipronil), V (vinhaça) e MV (mistura) nos tempos  $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  e  $t_3$

Ordem Família/ Tribo	GA	$t_0$						$t_1$					
		C	D	F	M	V	MV	C	D	F	M	V	MV
<b>Amphipoda</b>													
<i>Hyalellidae</i>		-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<b>Coleoptera</b>													
<i>Dryopidae</i>	T	-	-	-	-	6	4	12	2	1	3	7	2
<i>Dryopidae larvae</i>	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dysticidae</i>	P	15	9	6	4	12	9	6	5	-	2	11	6
<i>Dysticidae larvae</i>	P	-	-	-	-	2	-	1	2	-	-	1	-
<i>Elmidae</i>	R	6	3	15	8	-	-	17	6	-	-	-	-
<i>Elmidae larvae</i>	R	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Girinidae larvae</i>	P	-	-	1	8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hydrophilidae</i>	CC	1	-	-	3	1	-	-	-	-	-	1	-
<i>Hydrophilidae larvae</i>	CC	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-
<i>Noteridae</i>	P	-	4	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Diptera</b>													
<i>Chironomidae</i>	CC	32	25	29	30	47	29	48	25	-	-	13	5
<i>Culicidae</i>	CC	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	4	1
<i>Ephydriidae larvae</i>	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Orthoclaadiinae</i>	CC	9	17	19	16	8	2	15	24	-	-	1	1
<i>Pupa</i>	CC	5	3	4	5	3	3	1	1	-	-	-	-
<i>Simuliidae</i>	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ephemeroptera</b>													
<i>Caenidae</i>	CC	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gastropoda</b>													
<i>Lymnaeidae</i>	R	52	36	49	42	19	6	79	70	115	21	5	6
<i>Planorbidae</i>	R	44	72	121	116	79	20	121	109	306	490	13	22
<b>Hemiptera</b>													
<i>Belostomatidae</i>	P	2	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Hebridae</i>	P	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mesoveliidae</i>	P	30	6	15	3	11	2	7	-	4	2	-	1
<i>Naucoriidae</i>	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Napidae</i>	P	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Notonectidae</i>	P	13	-	1	1	20	2	9	-	-	-	4	-

<i>Pleidae</i>	P	1	-	-	-	4	-	-	1	-	-	-	-
<i>Veliidae</i>	P	33	1	16	5	37	4	54	7	29	18	2	6
<b>Odonata</b>													
<i>Aeshinidae</i>	P	18	1	11	-	6	17	8	1	-	-	-	-
<i>Lestidae</i>	P	5	1	4	10	4	7	21	24	-	-	1	-
<i>Libellulidae</i>	P	99	40	90	62	68	73	97	92	-	-	25	-
<b>Oligochaeta</b>	CC	1359	1409	1266	1015	1135	1071	1889	2312	1757	2207	5	-
<b>Plecoptera</b>													
<i>Perlidae</i>	P	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<b>Trichoptera</b>													
<i>Hydroptilidae</i>	R	-	-	1	-	-	-	14	-	-	-	-	-
<i>Hydroptilidae larvae</i>	R		1	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela 5:** Composição, densidade e grupo alimentar de macroinvertebrados presentes nas raízes de *E. crassipes* durante período experimental nos tratamentos Controle (C), 2,4-D (D), Fipronil (F), M (mistura de 2,4-D e fipronil), V (vinhaça) e MV (mistura) nos tempos *t0*, *t1*, *t2* e *t3* (Continua)

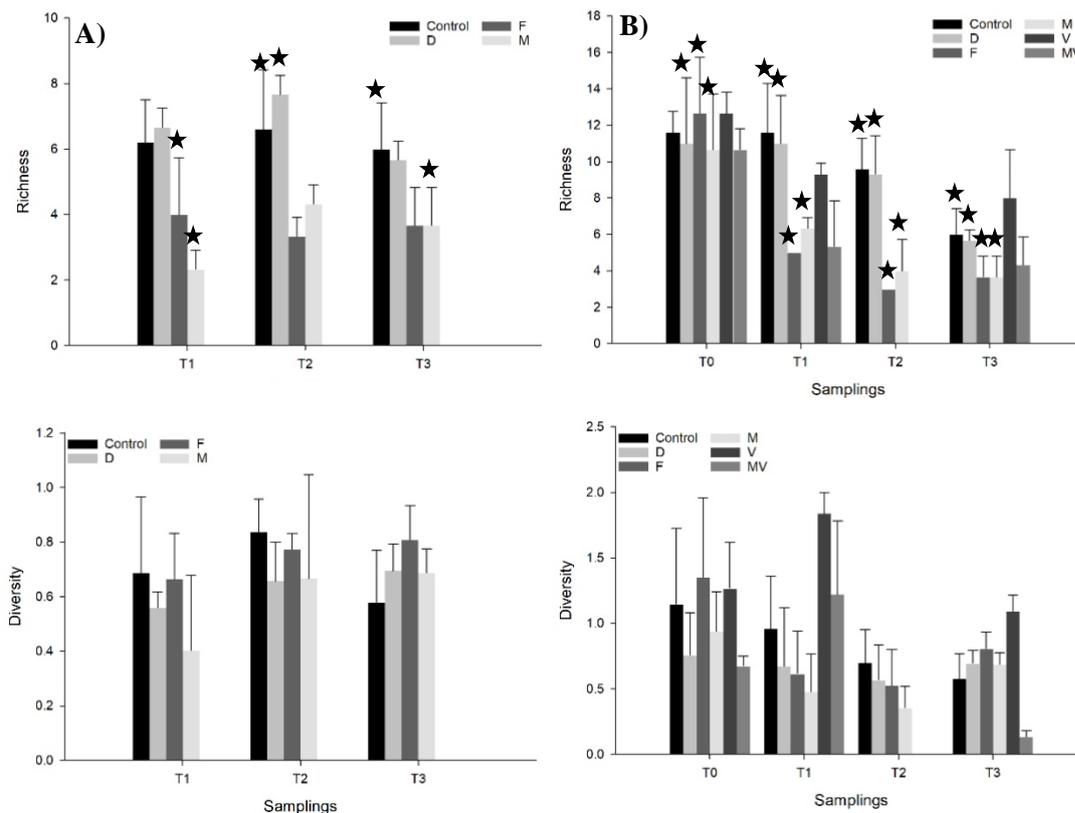
Ordem	Família/ Tribo	GA	<i>t2</i>				<i>t3</i>					
			C	D	F	M	C	D	F	M	V	MV
<b>Amphipoda</b>												
	<i>Hyalellidae</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Coleoptera</b>												
	<i>Dryopidae</i>	T	-	-	-	-	8	6	-	-	-	-
	<i>Dryopidae larvae</i>	T	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	<i>Dysticidae</i>	P	7	1	-	1	5	12	1	-	12	-
	<i>Dysticidae larvae</i>	P	-	-	-	-	1	9	5	-	21	-
	<i>Elmidae</i>	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Elmidae larvae</i>	R	31	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Girinidae larvae</i>	P	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Hydrophilidae</i>	CC	2	-	-	-	1	-	-	-	1	-
	<i>Hydrophilidae larvae</i>	CC	-	-	-	-	1	-	-	-	10	-
	<i>Noteridae</i>	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Diptera</b>												
	<i>Chironomidae</i>	CC	6	15	-	-	6	27	6	-	95	13
	<i>Culicidae</i>	CC	-	-	-	-	1	-	-	-	6	-
	<i>Ephydriidae larvae</i>	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-
	<i>Orthoclaadiinae</i>	CC	30	5	-	-	61	8	2	-	23	-
	<i>Pupa</i>	CC	-	2	-	-	-	2	-	-	20	-
	<i>Simuliidae</i>	CC	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ephemeroptera</b>												
	<i>Caenidae</i>	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gastropoda</b>												
	<i>Lymnaeidae</i>	R	105	91	73	38	74	29	95	64	-	-
	<i>Planorbidae</i>	R	403	305	284	376	392	302	192	84	2	8
<b>Hemiptera</b>												
	<i>Belostomatidae</i>	P	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
	<i>Hebridae</i>	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Mesoveliidae</i>	P	6	2	-	1	-	1	-	1	1	-
	<i>Naucoriidae</i>	P	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
	<i>Nepidae</i>	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Notonectidae</i>	P	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-

<i>Pleidae</i>	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Veliidae</i>	P	1	4	-	2	7	1	1	1	8	1
<b>Odonata</b>											
<i>Aeshinidae</i>	P	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lestidae</i>	P	2	6	-	-	4	5	-	-	1	-
<i>Libellulidae</i>	P	117	58	-	-	182	120	-	-	-	-
<b>Oligochaeta</b>	CC	4474	2722	3248	3075	5204	2195	476	418	541	157
<b>Plecoptera</b>											
<i>Perlidae</i>	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Trichoptera</b>											
<i>Hydroptilidae</i>	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hydroptilidae larvae</i>	R	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>		5189	3213	3605	3493	5948	2721	778	569	747	179
<b>Total</b>		<b>45.701</b>									

**Legenda:** GA: grupo alimentar, T: triturador; P: predador; R: raspador; CC: colector-catador

Os valores de riqueza de famílias para a macrofauna associada às raízes da macrófita *P. stratiotes* foi de  $6\pm 0.6$  no tratamento Controle e de  $6\pm 1.6$  no tratamento D, enquanto nos tratamentos F e M, os valores foram 50% menores quando comparados ao Controle e D ( $3\pm 1$ ), conforme apresentado na figura 23. Analisando todos os tratamentos entre si, diferenças estatísticas foram observadas entre Ft1 e Dt2 ( $p\leq 0,032$ ), Mt1 e Ct2 ( $p\leq 0,002$ ), Ct3 ( $p\leq 0,011$ ) e Dt2 ( $p\leq 0,0005$ ) e também houve diferença entre Mt3 e Dt2 ( $p\leq 0,014$ ).

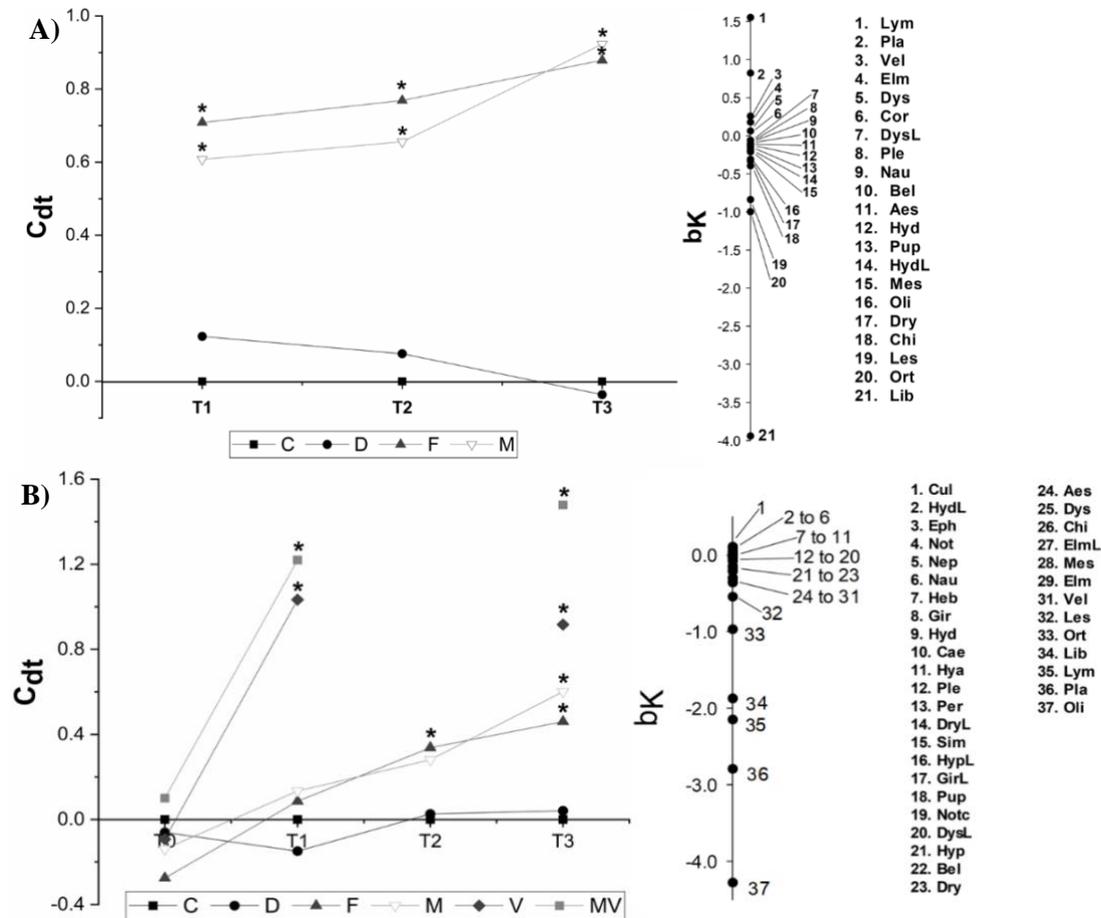
Para a diversidade da macrofauna, no controle foi obtido o maior valor ( $0.7\pm 0.1$  bits/ind), sendo a diversidade de espécies similar entre os demais tratamentos ( $0.6\pm 0.1$ ). Embora os valores calculados dos índices sejam similares, quando analisados estatisticamente algumas diferenças entre as amostragens e tratamentos foram observadas, sendo os controles diferentes entre as amostragens (Ct3 diferente de Ct1 ( $p\leq 0.0144$ ) e Ct2 ( $p\leq 0.0144$ )). O tratamento Dt3 apresentou diferença entre os controles nas amostragens t1 ( $p\leq 0.00137$ ) e t2 ( $p\leq 0.00137$ ). Os tratamentos com a presença do fipronil (F e M) foram aqueles que apresentaram as maiores diferenças estatísticas, sendo Ft0 diferente de Dt3 ( $p\leq 0.007$ ); Ft1 diferente de Ct1 ( $p\leq 0.003$ ), Ct2 ( $p\leq 0.004$ ), Dt0 ( $p\leq 0.03$ ), Dt1 ( $p\leq 0.021$ ) e Ft0 ( $p\leq 0.007$ ); Ft2 mostrou diferenças com o Ct1 ( $p\leq 0.0001$ ), Ct2 ( $p\leq 0.0003$ ), Dt0 ( $p\leq 0.004$ ), Dt1 ( $p\leq 0.004$ ) e Ft0 ( $p\leq 0.0004$ ) e Ft3 foi diferente de Ct1 ( $p\leq 0.003$ ), Ct2 ( $p\leq 0.004$ ), Dt0 ( $p\leq 0.03$ ), Dt1 ( $p\leq 0.021$ ) e Ft0 ( $p\leq 0.007$ ). Em relação aos tratamentos da mistura diferenças foram observadas em todas as amostragens, sendo que em t2 verificou-se maior diferença entre os demais tratamentos: Mt0 foi diferente de Ft2 ( $p\leq 0.002$ ) e Ft3 ( $p\leq 0.007$ ); Mt1 foi diferente de Ct1 ( $p\leq 0.04$ ), Ct2 ( $p\leq 0.024$ ) e Ft0 ( $p\leq 0.022$ ); Mt2 foi diferente de Ct1 ( $p\leq 0.0005$ ), Ct2 ( $p\leq 0.0005$ ), Ct3 ( $p\leq 0.016$ ), Dt0 ( $p\leq 0.0007$ ), Dt1 ( $p\leq 0.0007$ ), Dt2 ( $p\leq 0.045$ ), Ft0 ( $p\leq 0.0004$ ), Mt0 ( $p\leq 0.032$ ) e Mt3 foi diferente de Ct1 ( $p\leq 0.0003$ ), Ct2 ( $p\leq 0.0003$ ), Ct3 ( $p\leq 0.013$ ), Dt0 ( $p\leq 0.004$ ), Dt1 ( $p\leq 0.004$ ), Ft0 ( $p\leq 0.0003$ ) e Mt0 ( $p\leq 0.020$ ).



**Figura 24:** Valores de riqueza e diversidade de espécies (bits/ind.) obtidos para a fauna associada de macroinvertebrados nas macrófitas *P. stratiotes* (A) e *E. crassipes* (B), nos diferentes tratamentos e período de amostragem. (\* representa diferença estatística significativa entre os tratamentos)

As análises do Principal Response Curve (PRC) mostram quais famílias foram mais ou menos influenciadas em um tratamento ao longo do tempo, reforçando as análises anteriores (Figura 23). Na PRC, as famílias que apresentam valor próximo de zero não foram influenciadas pelos tratamentos e inversamente os valores abaixo de zero foram diretamente afetados, o que corrobora com o explicado acima para a macrófita *P. stratiotes*, onde as famílias menos incidentes foram Orthoclaadiinae, Chironomidae, Dryopidae, Lestidae e Libellulidae. Para a macrófita *E. crassipes* as famílias 1 a 11 (Culicidae, Hydrophilidae, Ephydriidae, Notonectidae, Nepidae, Naucoriidae, Hebridae, Gyrinidae, Hydroptilidae, Caenidae e Hyaellidae) foram as menos afetadas. Entre 12 e 31 estão as primeiras famílias que os efeitos foram moderados (Figura 24B). Pela análise da PCR (Figura 24B) verifica-se ainda que a família Oligochaeta foi a mais influenciada pela presença de fipronil, seguida por Planorbidae, Lymnaeidae, Libellulidae, Orthoclaadiinae e Lestidae. Tanto na análise da PRC quanto nos índices ecológicos não

foram relatados dados dos tratamentos V e MV, uma vez que a presença da vinhaça ocasionou a morte de todas as plantas após 10 dias de exposição.



**Figura 25:** Análise PRC para a comunidade de macroinvertebrados associados às macrófitas considerando os diferentes tratamentos e períodos de coleta para *P. stratiotes* (A) e *E. crassipes* (B)

Weston e Lydy (2014) determinaram as concentrações de efeito  $CE_{50}$  e concentração letal  $CL_{50}$  para 14 espécies de macroinvertebrados, onde a espécie mais sensível testada foi *Chironomus dilutus* ( $CE_{50-96h}$ : 32.5 ng/L). Para *Hyaella azteca*, Pinto et al. (2021a) obtiveram  $CE_{50-96h}$  de 729 ng/L ao avaliarem os efeitos (mortalidade e desenvolvimento) da mistura do 2,4-D e fipronil sobre *Hyaella azteca* e *Chironomus sancticaroli* em experimentos laboratoriais e nas mesmas estruturas experimentais (mesocosmos) utilizadas nesta pesquisa.

Como mencionado anteriormente, a presença do fipronil, isolado e em mistura com o 2,4-D, afetou diretamente a comunidade de macroinvertebrados após 7 dias de

exposição, diminuindo em 50% da riqueza em relação aos grupos C e D. O mesmo efeito foi observado em relação ao índice de diversidade, com redução de 13 para 4, sendo os oligoquetas os mais sensíveis.

Considerados como excelentes indicadores biológicos da qualidade dos ecossistemas aquáticos por serem amplamente distribuídos, abundantes e de fácil coleta, os macroinvertebrados bentônicos são relativamente sedentários e, assim, podem representar uma condição local e possuem ciclo de vida longo capazes assim de registrar a qualidade ambiental (METCALFE, 1989). Por serem sensíveis a vários tipos de degradação ambiental, podem apresentar desde alterações morfológicas a alterações em sua estrutura em relação a riqueza e diversidade das espécies presentes no sistema. É correto afirmar que os macroinvertebrados refletem o estado do ecossistema aquático (ROSENBERG; RESH, 1993).

Como são afetados pela composição do ambiente, no caso da presente pesquisa, a presença dos contaminantes fipronil, 2,4-D e vinhaça, afetaram claramente a composição da fauna previamente estabelecida nos mesocosmos anteriormente à contaminação, conseqüentemente afetando os grupos alimentares. Observando a fauna associada a *P. stratiotes*, os trituradores representados pela família Dryopidae, predadores – Lestidae e Libellulidae e, coletores-catadores Chironomus e Orthocladine foram os mais afetados, sendo estes cada vez mais escassos e até desaparecendo do sistema. Por outro lado, a presença dos contaminantes favoreceu a predominância de raspadores (Lymnaeidae, Planorbidae e Elmidae) outros predadores, como Dysticidae e Valiidae.

Fato interessante é que na fauna da *E. crassipes* dentre os grupos alimentares menos afetados, duas famílias, Libellulidae (predador) e Orthocladine (coletor-catador) que na *P. stratiotes* foram afetados, neste caso não foram afetados assim como os raspadores Lymnaeidae e Planorbidae. Ao mesmo tempo que outros predadores como Notonectidae e Nepidae e, coletores-catadores Culicidae, Ephydriidae e Hydrophilidae foram menos afetados pela presença dos contaminantes.

Em relação aos grupos funcionais de alimentares, para Kerans e Karr (1994), o impacto antrópico, principalmente da poluição orgânica, aumenta a percentagem de organismos coletores e diminui a percentagem de organismos predadores e fragmentadores, corroborando com o que observado durante a análise dos dados obtidos na presente pesquisa. Ao passo que a maior riqueza e abundância de raspadores em

plantas que possuem raízes maiores era esperada, por estas apresentarem uma superfície de contato maior, que, conseqüentemente, propicia a formação de biofilme mais eficiente, permitindo uma maior disponibilidade de alimento para esses organismos (VANNOTE et al., 1980).

### **7.2.5 Variáveis ambientais e quantificação de agrotóxicos**

Os valores médios obtidos para pH e temperatura da água foram de  $6,24 \pm 0,36$  e  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente, os quais permaneceram estáveis nos tratamentos C, F, D e M. Em relação à concentração de oxigênio dissolvido (OD) registrou-se redução de 4 mg L em  $t_0$  para menos de 2 mg L após a exposição, o que pode ser explicado pela decomposição da matéria orgânica morta das macrófitas (Pinto et al., 2021; Freitas et al., 2021).

Nos tratamentos com a presença de vinhaça (V e MV) os níveis de pH foram mais ácidos em  $t_1$  e  $t_2$  ( $4,7 \pm 0,11$ ), aumentando para  $6,89 \pm 0,17$  em  $t_3$ . Em relação à concentração de oxigênio dissolvido, todos os mesocosmos com vinhaça permaneceram em condições anóxicas ( $0,44 \pm 0,24$  mg O<sub>2</sub> L) em  $t_1$ . Os valores de condutividade, turbidez, clorofila e nutrientes são apresentados abaixo na Tabela 6.

**Tabela 6:** Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos quantificados nos mesocosmos durante o experimento

Parâmetros	<i>t0</i>											
	C	D	F	M	V	MV						
Temperatura (°C)	23.48	0.26	23.23	0.40	22.93	0.09	23.03	0.31	23.4	0.16	23.5	0.29
pH	6.02	0.25	5.99	0.05	6.07	0.20	6.08	0.15	4.61	0.06	4.60	0.04
Condutividade (µS/cm)	27.38	2.65	28.1	4.26	31.33	4.05	35.5	8.69	486.36	51.19	444.76	68.52
Oxigênio dissolvido (mg/L)	3.91	1.12	3.85	0.97	3.69	1.42	3.12	0.72	2.69	1.98	3.15	0.36
Saturação de OD (%)	45.78	13.48	44.3	11.75	40.7	14.94	35.06	9.18	31.23	22.47	36.63	4.62
Turbidez (NTU)	4.29	1.75	10.94	6.13	4.87	3.18	5.95	3.99	314	56.29	444.33	47.49
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	5.64	4.93	16.66	7.48	5.06	3.75	3.23	1.00	163.28	24.51	134.39	30.52
Clorofila <i>b</i> (µg/L)	7.94	6.66	23.67	10.94	8.74	8.21	4.3	2.14	33.68	28.66	14.28	4.91
Dureza	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Nutrientes totais volume (titulação)	0.68	0.95	0.25	0.12	0.26	0.02	0.25	0.05	3.36	2.40	3.36	0.53
N total (mg/L)	2.96	4.45	0.94	0.58	1.01	0.08	0.963	0.23	15.47	11.19	15.44	2.48
P total (ug/L)	209.65	109.12	311.35	131.35	286.91	103.27	189.63	16.77	1132.9	185.99	1351.9	146.23
NO <sub>2</sub> (ug/L) - Nitrito	3.03	0.92	4.57	0.09	3.61	0.50	2.927	1.21	5.79	0.71	3.086	0.22
POI (ug/L) - Fosfato inorgânico	8.33	3.16	82.61	24.36	24.19	13.23	9.93	1.21	47.33	41.41	176.48	6.90
PTD (ug/L) - Fosfato total dissolvido	20.13	2.90	158.98	35.78	56.24	17.69	25.54	6.71	179.52	34.52	265.30	1.16
NO <sub>3</sub> (ug/L) - Nitrato	17.38	8.93	158.74	204.06	238.84	206.79	47.85	20.28	45.9	19.53	98.38	83.60
SIO (mg/L) - Silicato	4.94	2.43	4.42	1.50	6.60	3.04	6.72	2.55	2.46	0.07	1.76	0.05
NH <sub>4</sub> (ug/L) - Amônia	352.57	392.53	144.36	45.09	97.32	23.75	150.79	23.20	221.24	130.47	369.47	27.10

**Legenda:** C: Controle; D: 2,4-D, F: fipronil; M: mistura; V: vinhaça; MV: mistura dos agrotóxicos (2,4-D e fipronil) + vinhaça e, NR: não reportado.

**Tabela 6:** Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos quantificados nos mesocosmos durante o experimento (Continua)

Parâmetros	<i>tI</i>											
	C		D		F		M		V		MV	
Temperatura (°C)	22.12	0.25	21.9	0.54	21.8	0.09	21.9	0.31	21.1	0.09	21.03	0.25
pH	5.88	0.13	5.87	0.17	5.84	0.32	5.96	0.19	4.78	0.04	4.80	0.03
Condutividade (µS/cm)	30.82	3.44	34.93	4.04	33.5	4.06	41.83	10.23	442.6	25.06	430.53	20.62
Oxigênio dissolvido (mg/L)	1.69	0.37	1.63	0.57	2.07	1.49	1.08	0.81	0.44	0.20	0.28	0.06
Saturação de OD (%)	19.26	4.17	18.83	6.96	23.3	16.76	12.2	9.57	4.83	2.21	3.1	0.57
Turbidez (NTU)	23.2	15.51	26.66	11.15	30	3.56	25	3.74	142.33	24.57	150.33	15.92
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	4.1	2.71	22.55	19.87	7.03	3.89	5.49	0.70	57.24	31.15	48.66	8.79
Clorofila <i>b</i> (µg/L)	5.01	4.10	31.01	23.82	8.94	7.82	4.60	1.23	15.42	6.82	25.50	24.60
Dureza	13.6	1.50	14	0.00	15.33	0.94	18	3.27	156.66	30.91	113.33	4.71
Nutrientes totais volume (titulação)	0.38	0.11	0.25	0.02	0.27	0.03	0.30	0.05	1.89	0.29	2.01	0.29
N total (mg/L)	1.54	0.53	0.96	0.12	1.04	0.15	1.18	0.23	8.61	1.34	9.14	1.35
P total (ug/L)	150.73	61.01	150.98	58.06	154.64	50.29	90.09	9.57	1048.68	217.70	1415.1	22.19
NO <sub>2</sub> (ug/L) - Nitrito	3.50	1.23	4.39	1.15	4.31	1.45	3.44	0.58	4.74	0.64	5.55	1.29
POI (ug/L) - Fosfato inorgânico	43.30	36.97	37.18	31.07	12.22	2.09	13.21	3.23	38.01	10.32	80.07	22.58
PTD (ug/L) - Fosfato total dissolvido	31.12	19.11	24.55	2.96	25.46	11.82	18.16	2.51	171.40	95.47	229.92	10.10
NO <sub>3</sub> (ug/L) - Nitrato	34.36	41.69	33.71	17.63	46.39	32.09	17.44	8.57	62.66	24.61	40.02	7.09
SIO (mg/L) - Silicato	86.39	73.57	70.6	17.38	104.38	80.14	55.46	22.07	150.64	110.94	2.55	0.26
NH <sub>4</sub> (ug/L) - Amônia	2.562	0.54	3.29	0.86	3.36	0.71	4.49	2.33	136.96	190.42	157.24	125.22

**Legenda:** C: Controle; D: 2,4-D, F: fipronil; M: mistura; V: vinhaça; MV: mistura dos agrotóxicos (2.4-D e fipronil) + vinhaça e, NR: não reportado.

**Tabela 6:** Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos quantificados nos mesocosmos durante o experimento (Continua)

Parâmetros	<i>t2</i>											
	C		D		F		M		V		MV	
Temperatura (°C)	23.38	0.24	23.30	0.29	23.13	0.12	23.20	0.00	22.27	0.12	22.33	0.29
pH	6.36	0.10	6.38	0.11	6.17	0.10	6.44	0.11	6.77	0.05	6.75	0.05
Condutividade (µS/cm)	34.32	5.43	46.13	4.75	42.13	14.14	59.15	16.57	541.00	31.44	521.50	44.45
Oxigênio dissolvido (mg/L)	2.01	1.07	1.07	0.51	2.38	1.34	1.33	0.62	0.53	0.19	0.49	0.30
Saturação de OD (%)	21.82	12.16	11.73	5.72	26.73	16.48	14.57	6.41	5.53	2.66	4.93	2.96
Turbidez (NTU)	6.65	3.58	6.85	4.66	6.16	1.61	7.60	2.46	34.90	1.15	43.67	9.14
Clorofila a (µg/L)	15.03	7.10	16.00	5.74	26.89	8.20	20.65	15.53	41.76	26.01	60.43	25.89
Clorofila b (µg/L)	28.60	15.09	27.09	14.78	40.88	9.10	25.13	11.98	73.23	51.79	182.67	111.53
Dureza	16.40	1.50	18.67	1.89	20.67	4.11	22.00	4.90	100.67	71.65	166.67	23.57
Nutrientes totais volume (titulação)	0.27	0.14	0.31	0.06	0.24	0.20	0.36	0.06	2.99	0.56	2.81	0.86
N total (mg/L)	1.04	0.64	1.21	0.30	0.97	0.82	1.44	0.29	13.72	2.60	12.87	4.03
P total (ug/L)	323.20	388.37	158.32	11.70	135.90	18.85	93.83	29.01	1021.38	125.57	1506.07	338.98
NO2 (ug/L) - Nitrito	1.97	0.25	2.87	0.93	2.71	0.44	2.73	1.35	14.29	10.28	15.46	7.91
POI (ug/L) - Fosfato inorgânico	98.05	3.45	9.90	1.73	32.60	19.83	6.72	3.54	213.00	272.86	67.42	51.94
PTD (ug/L) - Fosfato total dissolvido	115.22	2.63	29.10	3.25	52.43	23.04	21.03	8.07	353.83	314.95	265.38	152.32
NO3 (ug/L) - Nitrato	25.37	6.26	41.98	7.14	41.56	5.94	44.79	6.15	41.47	7.80	27.33	2.19
SIO (mg/L) - Silicato	2.61	0.78	2.73	0.35	3.97	1.95	4.59	2.47	5.59	1.83	5.56	0.68
NH4 (ug/L) - Amônia	78.95	18.62	60.64	11.10	55.13	7.86	49.47	11.64	1649.03	57.02	1706.57	58.44

**Legenda:** C: Controle; D: 2,4-D, F: fipronil; M: mistura; V: vinhaça; MV: mistura dos agrotóxicos (2,4-D e fipronil) + vinhaça e, NR: não reportado.

**Tabela 6:** Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos quantificados nos mesocosmos durante o experimento (Continua)

Parâmetros	<i>t3</i>											
	C		D		F		M		V		MV	
Temperatura (°C)	21.47	0.08	21.43	0.26	21.26	0.09	21.53	0.12	21.53	0.29	21.26	0.34
pH	6.68	0.12	6.62	0.04	6.84	0.19	6.91	0.05	6.93	0.29	7.11	0.09
Condutividade (µS/cm)	44.82	8.83	51.46	9.46	34.63	24.45	76.6	16.70	335.6	127.83	399.43	13.98
Oxigênio dissolvido (mg/L)	2.06	1.12	1.29	0.41	3.59	0.91	4.73	0.46	0.16	0.11	0.083	0.06
Saturação de OD (%)	23.1	12.67	14.6	4.65	51.26	22.23	53.6	5.11	1.86	1.35	0.83	0.68
Turbidez (NTU)	20.31	6.47	12.14	1.85	30.82	4.13	25.94	10.09	24.03	15.36	39.06	10.97
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	36.78	42.01	30.67	21.70	44.18	2.45	39.30	13.82	22.54	9.84	31.61	7.29
Clorofila <i>b</i> (µg/L)	58.24	72.00	33.94	20.99	63.71	14.83	46.58	12.11	19.86	10.26	32.25	14.97
Dureza	19	3.00	18.66	6.18	29.33	6.60	30	4.90	75.33	12.36	82.66	5.25
Nutrientes totais volume (titulação)	0.34	0.21	0.376	0.15	0.57	0.04	0.25	0.14	1.74	1.03	1.75	0.52
N total (mg/L)	1.37	0.96	1.52	0.68	2.45	0.19	0.93	0.66	7.88	4.79	7.96	2.42
P total (ug/L)	110.18	69.20	130.64	47.46	193.49	8.20	138.72	14.30	328.45	130.82	807.07	840.19
NO <sub>2</sub> (ug/L) - Nitrito	1.77	0.39	3.54	1.87	5.06	0.78	11.04	9.67	10.31	3.85	14.51	4.51
POI (ug/L) - Fosfato inorgânico	39.01	39.87	28.80	12.30	63.18	7.33	55.58	16.04	30.12	22.49	29.41	15.61
PTD (ug/L) - Fosfato total dissolvido	358.36	561.14	45.09	10.60	97.68	6.43	80.11	17.00	132.95	42.70	250.52	88.65
NO <sub>3</sub> (ug/L) - Nitrato	24.73	4.01	22.5	2.15	23.62	5.94	44.04	17.75	25.85	0.43	25.63	2.75
SIO (mg/L) - Silicato	2.70	0.53	2.97	0.23	5.74	1.45	5.63	1.68	5.44	0.85	6.85	1.54
NH <sub>4</sub> (ug/L) - Amônia	94.9	72.42	27.53	12.80	24.43	9.92	41.90	22.53	1792.26	56.09	1815.63	29.35

**Legenda:** C: Controle; D: 2,4-D, F: fipronil; M: mistura; V: vinhaça; MV: mistura dos agrotóxicos (2,4-D e fipronil) + vinhaça e, NR: não reportado.

Para a vinhaça, foi realizada por Pinto et al, (2021b) a caracterização físico-química da vinhaça bruta aplicada no mesocosmos, conforme apresentado na Tabela 7. As análises da vinhaça apontaram altas concentrações de potássio, cálcio e outros metais, que juntos podem levar a um aumento na salinização, condutividade e assim, toxicidade para os organismos. Além disso, a vinhaça aplicada nos mesocosmos apresentou pH ácido, altos valores de condutividade elétrica, dureza, nitrogênio total, fósforo, DBO e DQO. A combinação á isso, a água dos mesocosmos nos tratamentos com vinhaça, V e MV, durante o experimento apresentou altos teores de nitrogênio e fósforo, além de maiores níveis de condutividade, dureza e turbidez comparado com os valores reportados nos controles.

**Tabela 7:** Caracterização físico-química da vinhaça realizada por Pinto et al., (2021B)

<b>Parâmetro</b>	<b>Unidade</b>	<b>Concentração</b>
pH	–	3.91
Condutividade elétrica	mS cm <sup>-1</sup>	8.42
Sólidos totais dissolvidos	mg L <sup>-1</sup>	4450
Dureza	mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>	3500
Demanda biológica de oxigênio -DBO	mg L <sup>-1</sup>	46,500
Demanda química de oxigênio - DQO	mg L <sup>-1</sup>	107,000
N total	mg L <sup>-1</sup>	639
Amônia	mg L <sup>-1</sup>	53
P total	mg L <sup>-1</sup>	150
Cromo (Cr)	mg L <sup>-1</sup>	0.207
Cobre (Cu)	mg L <sup>-1</sup>	3
Chumbo (Pb)	mg L <sup>-1</sup>	0.340
Manganês (Mn)	mg L <sup>-1</sup>	6.24
Ferro (Fe)	mg L <sup>-1</sup>	247
Níquel (Ni)	mg L <sup>-1</sup>	0.183
Cadmio(Cd)	mg L <sup>-1</sup>	0.025
Zinco (Zn)	mg L <sup>-1</sup>	1.23
Cobalto (Co)	mg L <sup>-1</sup>	0.219
Lítio (Li)	mg L <sup>-1</sup>	0.031
Magnésio (Mg)	mg L <sup>-1</sup>	391
Antimônio (Sb)	mg L <sup>-1</sup>	0.530

Parâmetro	Unidade	Concentração
Alumínio (Al)	mg L <sup>-1</sup>	500
Bário (Ba)	mg L <sup>-1</sup>	2
Cálcio (Ca)	mg L <sup>-1</sup>	1140
Sódio (Na)	mg L <sup>-1</sup>	60
Potássio (K)	mg L <sup>-1</sup>	3360

Em relação aos agrotóxicos, após a quantificação do dia da aplicação, foram observados resíduos de 2,4-D e fipronil em concentrações muito baixas (10 vezes menores) nos tratamentos controle. A presença dos agrotóxicos não afetou o experimento, uma vez que os resíduos foram duas a cinco ordens de grandeza menores em relação aos mesocosmos tratados com ambos os agrotóxicos.

No tratamento M as concentrações iniciais de 2,4-D e fipronil foram semelhantes aos tratamentos isolados, D e F, sendo que nos tratamentos MV, a presença de fipronil foi menor que no tratamento F. As concentrações de 2,4-D foram semelhantes a D. Os valores dos agrotóxicos quantificados durante o experimento são parte da tese de doutorado de Goulart, 2022 – em preparação, por esta razão, os valores serão somente mencionados e não haverá uma discussão aprofundada em relação ao comportamento, quantificação e degradação dos agrotóxicos.

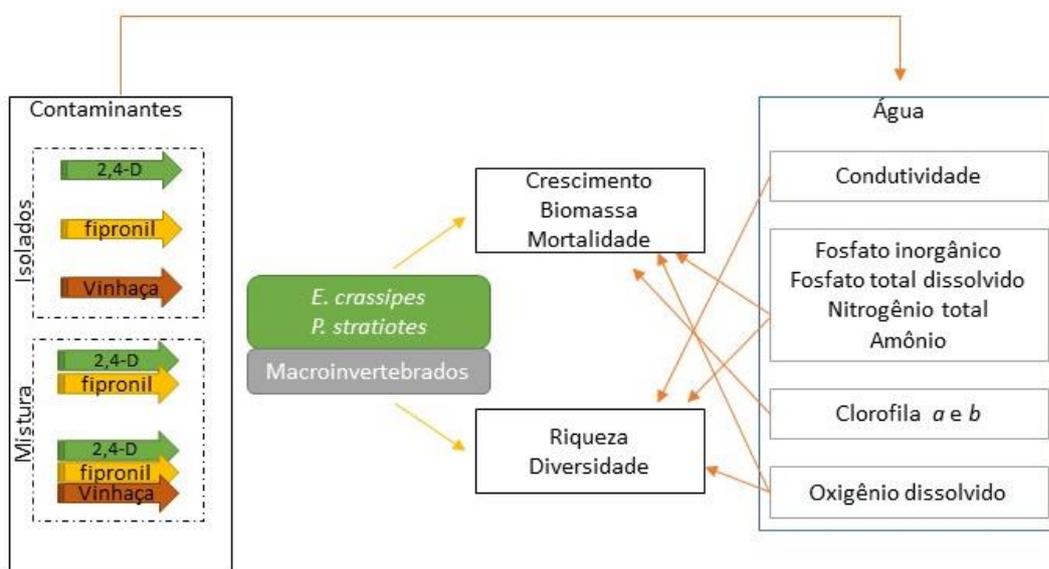
**Tabela 8:** Valores quantificados dos agrotóxicos, 2,4-D e fipronil, nos tratamentos C, D, F, M, V e MV 2 horas, 7, 30 e 75 após a contaminação.

Tratamento	2,4-D (µg L <sup>-1</sup> )				Fipronil (µg L <sup>-1</sup> )			
	2 h	7d	30d	75d	2 h	7d	30d	75d
<b>C</b>	0.038 ±0.054	0.16 ±0.022	0.08 ±0.025	0.0116 ±0.004	<LOQ	0.0044 ±0.001	0.002 ±0.0005	0.0009 ±0.0006
<b>D</b>	1384.8 ±268.4	522.5 ±54.4	303.6 ±83.8	122 ±78.9	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<b>F</b>	<LOQ	<LOQ	0.1 ±0.05	0.031 ±0.0074	42.5 ±11.22	8 ±1.04	2 ±1.25	0.1 ±0.085
<b>M</b>	1419.2 ±73.1	488.7 ±20.3	424.1 ±53.8	239.5 ±35	45 ±2.4	10.7 ±0.1	3.5 ±0.5	0.1 ±0.072
<b>V</b>	<LOQ	<LOQ	0.354	0.186	0.652 ±0.148	<LOQ	0.006	0.0042
<b>MV</b>	656.1 ±58.7	318.5 ±28.3	9.5	0.7	16.9 ±0.3	6.6 ±1.4	5.2	3.5

**Legenda:** C: Controle; D: 2,4-D, F: fipronil; M: mistura; V: vinhaça; MV: mistura dos agrotóxicos (2,4-D e fipronil) + vinhaça e, LOQ: Limite de quantificação.

Durante a concepção da pesquisa, foram discutidos os possíveis efeitos, diretos e indiretos, que os contaminantes poderiam causar não somente nas plantas, como também na fauna de macroinvertebrados e na qualidade da água, assim como elucidado figura 25.

Focando nos efeitos que o herbicida 2,4-D no sistema, era esperado que as plantas respondessem à exposição ao agrotóxico. O 2,4-D é um dos herbicidas mais antigos, datado da década de 1940, com um alto potencial de controle de plantas daninhas e relativamente baixo em custo, comparado com outros herbicidas avaliados no mercado (PETERSON et al., 2016). Embora o 2,4-D seja efetivo em dicotiledôneas ou plantas de folhas largas e, segundo o fabricante e a literatura, não apresenta qualquer efeito em monocotiledôneas no caso da presente pesquisa, foi observado que tanto dicotiledôneas quanto monocotiledôneas são afetadas em relação a crescimento, biomassa e desenvolvimento quando expostas ao herbicida, corroborando com Brock et al., (2000), Ebke et al., (2013) e Vervliet-Scheebaum et al., (2006) quando explicaram que a toxicidade de herbicidas que simulam auxinas em macrófitas aquáticas são subestimadas.



**Figura 26:** Resumo esquemático das hipóteses de efeitos diretos e indiretos causados pela exposição ao herbicida 2,4-D, inseticida fipronil e vinhaça, isolados e em mistura sobre as macrófitas *E. crassipes* e *P. stratiotes*, fauna de macroinvertebrados e qualidade da água.

Em relação ao inseticida fipronil, os efeitos observados no decorrer da pesquisa foram exatamente ao esperado. Mesmo sendo o fipronil uma substância considerada relativamente nova, presente no mercado desde os anos 1990, este é largamente utilizado em diversas culturas e, também e nos últimos anos tem sido cada vez mais utilizado para controlar insetos domésticos comuns, além de ser usado no tratamento de pulgas e carrapatos em animais de estimação. O fipronil atua como antagonista GABA, o que leva à excitação excessiva do SNC e à morte do inseto (ADAMS, 2012; TINGLE et al., 2000), sendo seus efeitos amplamente divulgados em diferentes insetos (BENCIC et al., 2013; PINTO et al., 2021a, 2021b; QURESHI et al., 2016).

Por fim, os resultados obtidos com a vinhaça também foram dentro do esperado. Onde a alta demanda e disponibilidade de nutrientes não somente afetaram os organismos testados, macrófitas e macroinvertebrados, como diretamente afetou a o sistema, elevando os valores de nutrientes na água como o P total, amônia, fosfato total disponível, magnésio e cálcio.

Tan et al, (2019) explicam que a longa exposição de amônia em altas concentrações podem afetar o crescimento das macrófitas aquáticas e, segundo Thomaz (2002) o rápido incremento de nutrientes e sólidos suspensos nos ecossistemas aquáticos, resultantes da ação antrópica (eutrofização artificial), pode ser considerado um dos processos que mais afetam a estrutura das assembleias de macrófitas aquáticas. A evolução do processo de eutrofização causa a perda de espécies, principalmente as submersas, pois, com o desenvolvimento de algas planctônicas, a radiação subaquática passa a ser o principal fator limitante.

Outros fatores limitantes para o crescimento das macrófitas são a hipóxia do sistema, e os altos valores de condutividade e turbidez reportados durante o experimento, sendo este último diretamente influenciável a pouca, ou não, colonização de macrófitas aquáticas (THOMAZ; BINI; PAGIORO, 2004). Assim como para as macrófitas, os altos valores de turbidez também afetam a comunidade de macroinvertebrados no sistema, reduzindo as taxas de riqueza e diversidade (STEWART; DOWNING, 2008; VAN DE MEUTTER; STOKS; MEESTER, 2005).

### 7.3 Modelos ecossistêmicos em clima temperado (Renkun, Países Baixos)

#### 7.3.1 *Glyceria máxima*

Os efeitos observados do 2,4-D sobre a macrófita *Glyceria maxima* são apresentados na Figura 24. Com os resultados obtidos após 14 dias de exposição, considerando comprimento total da parte aérea, biomassa fresca das folhas e comprimento das raízes, nenhum efeito estatisticamente significativo foi observado para qualquer tratamento em comparação com o controle. Para biomassa seca das folhas, apenas no tratamento C2 (10 µg L) verificou-se diferença significativa ( $p \leq 0.01852$ ) em relação ao controle. Na biomassa fresca das raízes, a diferença significativa ( $p \leq 0.00786$ ) foi observada apenas no tratamento C4 (1000 µg L).

Após 28 dias, a biomassa foi a única alteração registrada após exposição. A biomassa seca das folhas no tratamento C3 (100 µg L) teve diferença significativa ( $p \leq 0.035133$ ) em relação ao controle, o mesmo para a biomassa fresca das raízes ( $p \leq 0.00212$ ). Para a biomassa seca das raízes, C2 (10 µg L), C4 (1000 µg L) e C5 (3000 µg L<sup>-1</sup>) também mostraram uma diferença em comparação com o controle ( $p \leq 0.0414$ ,  $p \leq 0.0114$ , e  $p \leq 0.0057$ , respectivamente).

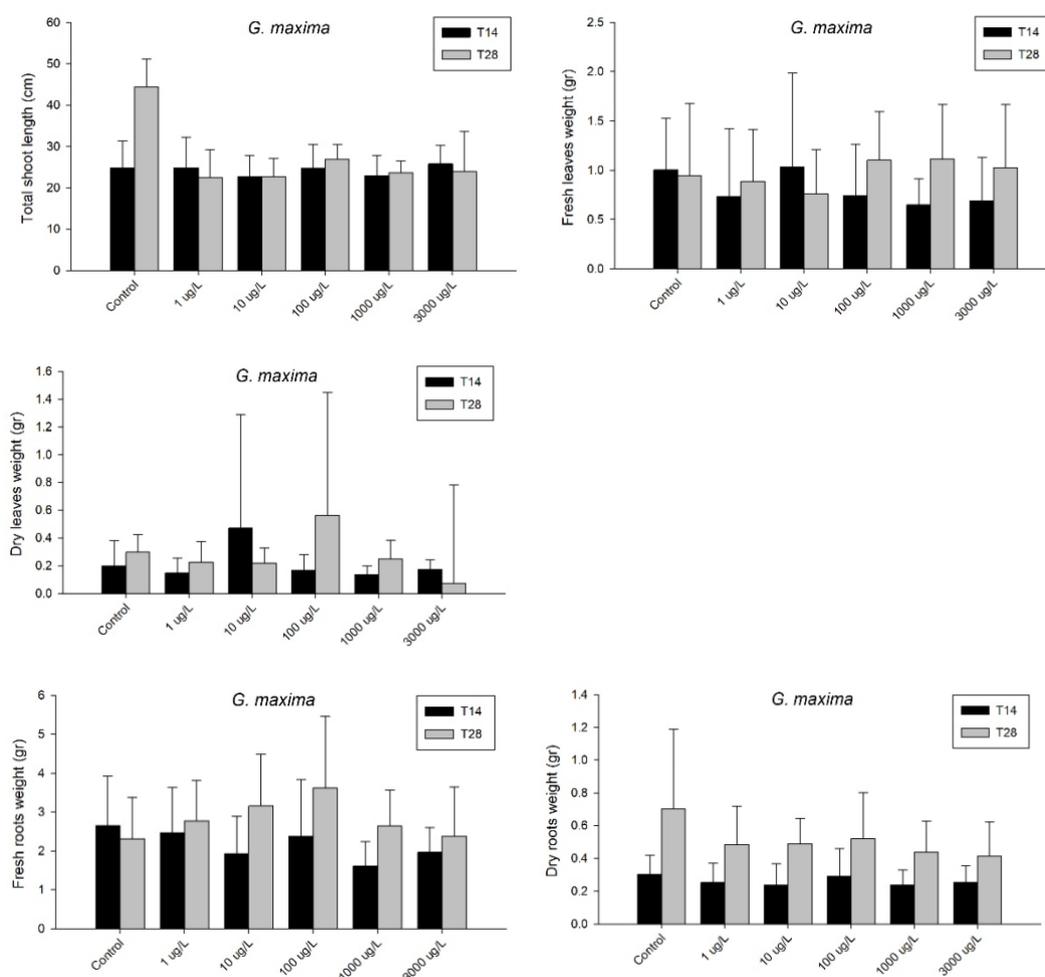
A concentração de efeito (CE<sub>10</sub>; 20; 50) após 28 dias foi calculada para todos os parâmetros, além do comprimento total do caule, biomassa fresca das folhas, taxa de crescimento das raízes e biomassa seca das raízes. Os valores de CE<sub>10</sub>; CE<sub>20</sub> e CE<sub>50</sub> estão dentro de uma ordem de grandeza entre 0,002 e 7852,44 µg L (Tabela 5).

**Tabela 5:** Valores de CE<sub>10</sub>, CE<sub>20</sub> e CE<sub>50</sub> calculados para a espécie *G. maxima* após dias de exposição ao 2,4-D

<i>Endpoint</i>	<i>EC</i> <sub>10</sub> (µg L <sup>-1</sup> )	<i>EC</i> <sub>20</sub> (µg L <sup>-1</sup> )	<i>EC</i> <sub>50</sub> (µg L <sup>-1</sup> )
<b>Tamanho total do caule</b>	-	-	-
Biomassa fresca - folhas	-	-	-
Biomassa seca - folhas	1375,44	2616,18	7852,44
Crescimento das raízes	-	-	-
Média de crescimento das raízes	1,06E-02	1,49E-04	1,02E-07
Biomassa seca das raízes	-	-	0,002

O herbicida 2,4-D é uma auxina sintética, um hormônio vegetal absorvido pelas folhas de uma planta, e embora seja muito eficaz para dicotiledôneas ou plantas de folha larga, o 2,4-D não é tão tóxico para monocotiledôneas, como para a espécie *G. maxima* (CLARK; PAZDERNIK, 2016). A literatura propõe que a seletividade da auxina se deve à rápida degradação da auxina exógena, anatomia vascular alterada ou percepção alterada da auxina e/ou translocação limitada (PETERSON et al., 2016; TORRA et al., 2017).

A porcentagem de inibição da taxa de crescimento foi calculada com base na OECD 238 (OECD 2014b), no dia 14 após a contaminação no tratamento C1 (1 µg L): -0.14%; C2 (10 µg L): 7%; C3 (100 µg L): 2; C4 (1000 µg L): 7% e C5 (3000 µg L): -3%. No dia 28 após a contaminação, apenas em C5 (3000 µg L) a inibição da taxa de crescimento foi positiva, enquanto que em C1, C2, C3 e C4 a inibição da taxa de crescimento foi negativa: -7%; -15%; -11% e -10%, respectivamente. Os valores muito baixos e negativos obtidos de inibição da taxa de crescimento para *G. maxima* podem ser associados ao 2,4-D, que em menor concentração atua como promotor de crescimento da planta, potencializando o seu crescimento (TIWARI; KHARWAR; TIWARI, 2019).



**Figura 27:** Endpoints avaliados para a espécie *G. maxima* mediante exposição às diferentes concentrações do herbicida 2,4-D após 14 e 28 dias da adição do contaminante.

### 7.3.2 *Myriophyllum spicatum*

*Myriophyllum spicatum* é uma dicotiledônea e já possui um protocolo de teste estabelecido pelas normas internacionais (OECD, 2014a, 2014b), sendo que a importância e a sensibilidade desta macrófita aos diversos contaminantes são bem conhecidas na literatura (KNAUER; MOHR; FEILER, 2008). A comparação dos dados de comprimento total da parte aérea, obtidos no dia 14 após a contaminação, do controle e as demais concentrações mostra que apenas C4 (1000 µg L) e C5 (3000 µg L) são estatisticamente diferentes ( $p = 2.65 \times 10^{-10}$  e  $p = 2.66 \times 10^{-07}$ ), respectivamente. O peso da biomassa fresca foi significativo apenas em C1 (1 µg L), com  $p = 0.00137$ , e em C2 (10 µg L), com  $p=0.02821$ , em comparação com o controle. O peso da biomassa seca apresentou diferença significativa em C4 (1000 µg L<sup>-1</sup>), com  $p=0.00691$  e C5 (3000 µg L<sup>-1</sup>), com  $p=0.00367$ , em relação ao controle.

No dia 28, os tratamentos C3 (100 µg L), C4 (1000 µg L) e C5 (3000 µg L), em comparação com o controle, apresentaram diferença significativa no comprimento total da parte aérea ( $p = 1,04 \times 10^{-6}$ ,  $p = < 2 \times 10^{-16}$  e  $p = < 0,0011$ , respectivamente) e no peso de biomassa fresca ( $p = 2,27 \times 10^{-6}$ ,  $p = 1,25 \times 10^{-10}$  e  $p = 1,25 \times 10^{-10}$ ). Para o peso final da biomassa seca, apenas C1 (1 µg L;  $p=0.0397$ ) foi diferente do controle.

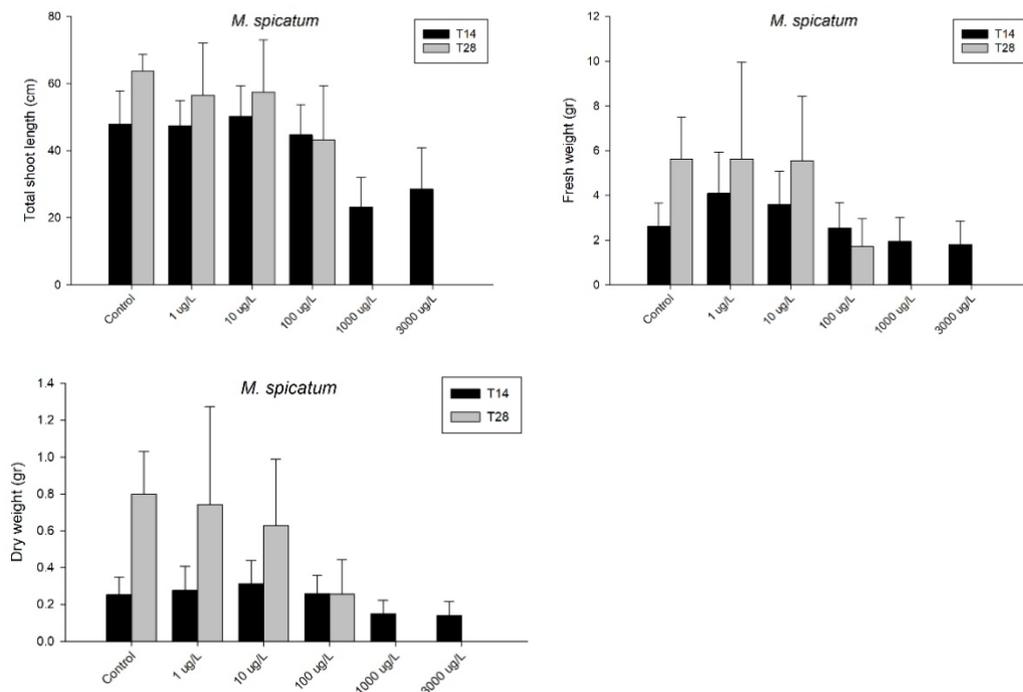
Os valores de  $CE_{10}$ ,  $CE_{20}$ , e  $CE_{50}$  para os dias 14 e 28 após a contaminação, foram calculados para todos os tratamentos, situando-se dentro de uma ordem de magnitude entre 9,19 e 3279,87 µg L (Tabela 9).

**Tabela 9:** Valores de  $CE_{10}$ ;  $CE_{20}$  e  $CE_{50}$  calculados para a *M. spicatum* nos dias 14 e 28 após a contaminação com 2,4-D

<i>Endpoint</i>	<i>EC<sub>10</sub> (µg L)</i>	<i>EC<sub>20</sub> (µg L)</i>	<i>EC<sub>50</sub>(µg L)</i>
<b><i>Dia 14</i></b>			
Média do tamanho total	21,38	46,95	180,08
Média da biomassa fresca	27,51	75,52	424,38
Média da biomassa seca	51,41	132,09	662,84
<b><i>Dia 28</i></b>			
Média do tamanho total	68,67	76,99	93,62
Média da biomassa fresca	30,75	37,93	54,32
Média da biomassa seca	66,24	74,78	92,01

A porcentagem de inibição da taxa de crescimento foi calculada nos dias 14 e 28 após a contaminação, usando os dados de comprimento total da parte aérea. No dia 14 após a contaminação, os seguintes valores de inibição de crescimento foram obtidos em C3 (100 µg L): 1.48%; C4 (1000 µg L): 48.88% e C5 (3000 µg L): 37.06%, enquanto que em C1 (1 µg L): -4.69% e C2 (10 µg L): 10.50% foram negativos. A inibição de crescimento no dia 28 foi negativa em C1 (1 µg): -15.23% e em C2 (10 µg L): -17. %, sendo positiva nos demais tratamentos: em C3 (100 µg L): 12%, C4 (1000 µg L) 100% e C5 (3000 µg L) 100%.

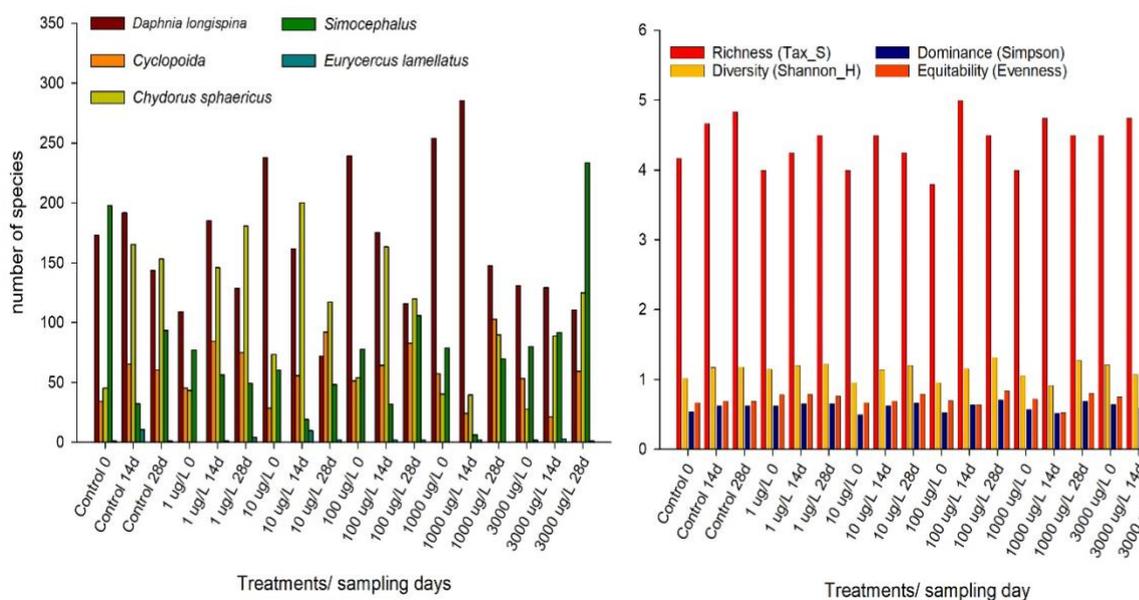
De acordo com os dados disponíveis na literatura, o 2,4-D provoca efeitos em *M. spicatum* em uma faixa de 20 a 5000 µg/L, os quais se relacionam à mortalidade, diminuição do crescimento e coloração marrom (EBKE; FELTEN; DÖREN, 2013; FORSYTH; MARTIN; SHAW, 1997; KOBRAEI; WHITE, 1996; MARKO; WHITE, 2018; SWANSON et al., 1991; TURGUT, 2007; TURGUT; FOMIN, 2002).



**Figura 28:** Endpoints avaliados para a espécie *M. spicatum* mediante exposição às diferentes concentrações do herbicida 2,4-D após 14 e 28 dias da adição do contaminante.

### 7.3.3 Comunidades zooplânctônica e de invertebrados

Um total de 32.261 indivíduos foram identificados e contados na comunidade de zooplâncton, correspondendo aos táxons *Daphnia longispina*, *Cyclopoida* spp., *Chydorus sphaericus*, *Simocephalus* spp. e *Eurycercus lamellatus* (Figura 26). *Daphnia longispina*, *Chydorus sphaericus* e *Simocephalus* spp. foram as espécies mais recorrentes entre os tratamentos e amostragens. A comparação entre os tratamentos e dentro das amostras não apresenta diferença significativa nos índices ecológicos aplicados (Riqueza (Tax\_S), Diversidade (Shannon\_H), Dominância (Simpson) e Equitabilidade (Evenness)). Alguns estudos têm mostrado que a exposição de 2,4-D pode afetar a comunidade de zooplâncton, mesmo este tendo uma ação de herbicida. SILVA et al. (2020), por exemplo, obtiveram uma EC<sub>50</sub>48h de 169 µg L para a espécie *C. silvestrii*. Na maioria dos estudos, no entanto, nenhum efeito foi observado após a exposição da comunidade zooplânctônica ao 2,4-D nas concentrações testadas no presente estudo (RELYEA, 2009; WANG et al., 2016).



**Figura 29:** Composição, densidade e índices ecológicos obtidos para a comunidade zooplânctônica presente nos diferentes tratamentos com 2,4-D

Ao final do experimento (dia 28 após contaminação) foram retiradas as armadilhas para a análise da comunidade de macroinvertebrados. Foram identificados quatro grupos alimentares: raspadores (família Asellidae), triturador (família Lymnaea), triturador/coletor (família Chironomidae) e predador (famílias Corixidae, Glossiphoniidae e Notonectidae). No início do estudo, quatro famílias (Asellidae, Chironomidae), Corixidae e, Lymnaea) foram adicionadas em cada mesocosmo e, para além destas famílias, ao final, outras duas famílias foram identificadas nos mesocosmos: Glossiphoniidae e Notonectidae.

Em relação aos índices ecológicos, não foi relatada diferença significativa entre os tratamentos e o tempo. Em Pinto et. al, (2021a, 2021a) a menor concentração reportada de 2,4-D que causou efeito nos Chironomidae tropicais foi de  $426 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que para o anfípoda *H. meinerti*, concentrações de até  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  não apresentaram efeitos tóxicos. Siemering et. al. (2008) e Harry et. al. (2014) testaram a resposta da comunidade de macroinvertebrados à exposição de 2,4-D após 2 semanas e 50 dias, e não observaram diferenças ou uma correlação significativa entre o 2,4-D e a abundância de todos as

espécies ou um grupo específico. A hipótese está relacionada à rápida redução na concentração de 2,4-D na água.

#### 7.3.4 Variáveis ambientais e quantificação de 2,4-D na água

Nos mesocosmos avaliados, os valores de pH variaram entre 7.9 e 10.1 em todos os tratamentos, com o valor de 9.9 registrado na concentração mais elevada de 2,4-D (3000 µg/L) no dia 28, apesar do valor mais alto de pH ter ocorrido em C1 (1 µg/L):10,1, no dia da adição do agrotóxico. A temperatura aumentou de 13.5 °C para 18.4 °C durante todo o experimento. A concentração de oxigênio foi superior a 8,2 mg/L em todos os tratamentos e a condutividade variou entre 27,4 a 18 µS/cm.

As concentrações de clorofila *a* na água ficaram entre 11,4 e 24,4 mg/L e entre 14,38 e 30,9 mg/L nos dias 14 e 28, respectivamente. As concentrações de fosfato (P-PO<sub>4</sub>) foram similares no microcosmos antes da contaminação, variando entre 17±5 µg/L. 14 dias após a contaminação, houve um decréscimo em todos os microcosmos 4±2 µg/L, exceto pelo tratamento C1 que manteve o mesmo valor reportado no tempo 0, 20 µg/L antes da contaminação. Por fim, 28 dias após a contaminação, os valores reportados no controle e nas concentrações C1 à C3, seguiram o mesmo padrão da coleta anterior 4±2 µg/L, e nos tratamentos C4 e C5, os valores foram de 12.2 e 11 µg/L, respectivamente.

Os valores das concentrações de nitrogênio (N-(NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>)) reportados no início do experimento 1.76±2 µg/L diminuíram em todos os tratamentos, inclusive no controle, após 14 (0.54±0.4 µg/L) e 28 dias (0.05 ±0.3 µg/L) em comparação com o dia da aplicação do 2,4-D. Por fim, em relação aos valores de amônio (N-NH<sub>4</sub>) medidos durante o experimento não ultrapassaram os valores de 0.5±0.2 µg/L, sendo que os valores obtidos nos tratamentos com 2,4-D se mantiveram similares aos quantificados no grupo controle.

As concentrações de 2,4-D nas amostras de água são apresentadas na Tabela 7. As concentrações iniciais de 2,4-D no experimento foram 1 ±0.3, 9.7 ±0.4, 99.85 ±0.2, 992.98 ±3 e 2995.02 ±5.01 µg a.i. L em comparação com as respectivas concentrações nominais de 0.81 ±0.2, 8.6 ±1.5, 91.07 ±5.2, 844.78 ±100 e 2601.14 ±100 µg a.i. L<sup>-1</sup>.

**Tabela 10:** Valores de 2,4-D quantificados nos microcosmos durante o experimento (µg a.i. L)

Tratamento	Pretendida	Inicial	Nominal	3d	8d	14d	28d
C1	1	1	0.81	1.71	0.79	0.59	0.49

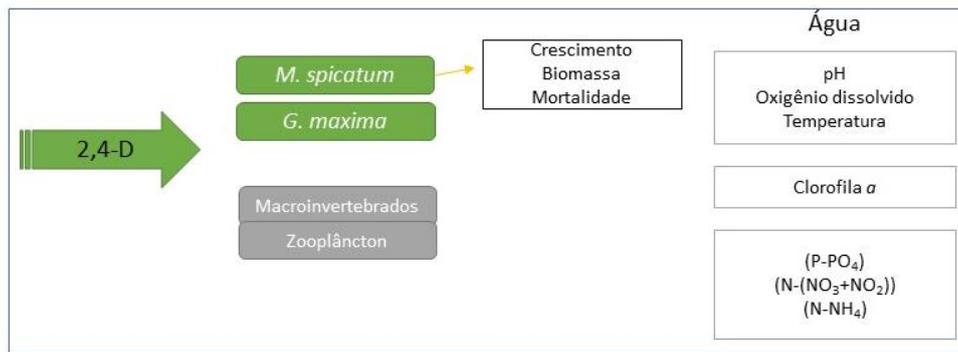
C2	10	9.7	8.6	8.98	7.65	5.83	4.82
C3	100	99.85	91.07	80.99	77.78	59.54	51.12
C4	1000	992.98	844,78	1071.02	1013.50	980.43	537.90
C5	3000	2995.02	2601.14	3082.303	3011.98	2829.12	1966.60

Entre os dias 14 e 28, a concentração de 2,4-D diminuiu entre 9 a 12% nas concentrações baixas testadas e nas concentrações superiores testadas (1000 e 3000 µg a.i./L) a degradação foi de 33 a 50%, respectivamente. O padrão de degradação de 2,4-D neste experimento segue o que é relatado na literatura, variando de 4,7 a 17 dias, dependendo das condições da água (ABATE JOTE, 2019; CARVALHO et al., 2020; HAHN; LOUREIRO-CRIPPA, 2006; TU et al., 2001).

Nesta etapa, os resultados obtidos seguiram o que foi pensado e levantado como hipótese durante a concepção da pesquisa e do experimento (Figura 29). Assim, era esperado que o herbicida 2,4-D afetasse a espécie dicotiledônia *M. aquaticum*, resultando na redução do crescimento e até a mortalidade, como foi reportado, após 14 dia de exposição os efeitos citados acima já foram observados.

Em contrapartida, para a espécie dicotiledônia *G. maxima* efeitos significativos não foram observados. Assim, neste ponto, cabe ressaltar que quando as espécies de clima tropical foram expostas ao mesmo contaminante, efeitos de crescimento e desenvolvimento foram observados, corroborando com a discussão levantada por Daam e Van den Brink (2010) acerca da maior sensibilidade à agrotóxicos por parte de espécies tropicais comparadas com espécies de clima temperado.

Finalmente, em relação à fauna de macroinvertebrados e zooplâncton estudadas, efeitos diretos não foram observados durante a execução do experimento, levantado assim, 2 hipóteses: 1) a curta exposição das faunas ao contaminante e, 2) a rápida degradação do 2,4-D no sistema. Importante ressaltar que, embora efeitos não foram observados na presente pesquisa, efeitos do herbicida 2,4-D em macroinvertebrados, zooplâncton e anfíbios são reportados na literatura (DA SILVA PINTO et al., 2021; FREITAS et al., 2019; MOREIRA et al., 2020; PINTO et al., 2021b; SILVA et al., 2020, 2021).



**Figura 30:** Resumo esquemático das hipóteses de feitos diretos e indiretos causados pela exposição ao herbicida 2,4-D sobre as macrófitas *M. spicatum* e *G. maxima*, fauna de macroinvertebrados e zooplâncton e qualidade da água.

## 8. CONCLUSÕES

Retomando as hipóteses levantadas para a presente tese, conclui-se que:

A) As concentrações ambientalmente realísticas do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil (isolados e em mistura) causam efeitos no crescimento, desenvolvimento e aparato fotossintético nas macrófitas aquáticas tropicais *Landoltia punctata* e *Myriophyllum aquaticum*.

B) As doses recomendadas para o cultivo de cana-de-açúcar dos contaminantes 2,4-D e fipronil (isolados e em mistura) testados em escala de modelos ecossistêmicos afetam o desenvolvimento (crescimento de caule, raízes e biomassa) das macrófitas aquáticas *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes*, bem como as concentrações dos nutrientes nitrogênio, fósforo e carbono disponível para as plantas e, conseqüentemente, a fauna associada de macroinvertebrados, ocasionando a redução de riqueza e diversidade, afetando diretamente os grupos funcionais.

C) A combinação da vinhaça com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil no manejo nas culturas de cana-de-açúcar, causa efeitos no desenvolvimento das macrófitas *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes*, ocasionando a redução de riqueza e diversidade na fauna associada de macroinvertebrados, afetando diretamente os grupos funcionais.

D) Por fim, com os dados obtidos na presente tese, conclui-se que as espécies de clima temperado, como *Glyceria maxima* (monocotiledônea) e *Myriophyllum spicatum* (dicotiledônea), quando expostas ao herbicida 2,4-D, apresentam respostas diferentes (efeitos), sendo estas menos sensíveis quando comparadas às espécies tropicais.

## **9. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **9.1 Os estudos laboratoriais**

Como esperado, ambas as espécies *L. punctata* e *M. aquaticum* foram sensíveis aos tratamentos isolados de 2,4-D considerando todos os *endpoints* avaliados nesta pesquisa, o que já seria esperado pelo fato de se tratar de um herbicida, cujo modo de ação vai interferir nos processos fisiológicos da planta, implicando na redução da taxa reprodutiva, no crescimento e na sobrevivência das espécies. O estudo mostrou ainda que as concentrações ambientais reportadas podem ter efeitos sobre as macrófitas aquáticas que vivem nas regiões litorâneas dos corpos hídricos que se encontram inseridos dentro ou próximos das áreas das áreas de plantio, como o de cana-de-açúcar, por exemplo, interessante ressaltar que o fipronil, embora tenha ação inseticida, nas concentrações ambientalmente realísticas também afetou as espécies de macrófitas avaliadas nesta pesquisa, trazendo à discussão sobre quais foram os principais causadores dos efeitos observados: a substância ativa (fipronil) ou os compostos inertes presentes na formulação. Além disso, mesmo com o antagonismo relatado em quase todos os tratamentos, a mistura de 2,4-D e fipronil pode afetar o crescimento por estimulação sintética de auxinas e o conteúdo de pigmentos das macrófitas. Os resultados mostram como as espécies aquáticas de regiões tropicais são sensíveis à adição dos agrotóxicos, demonstrando a importância de se utilizar não somente espécies padronizadas nas zonas temporadas, mas também outras espécies que são nativas das regiões onde a avaliação de risco está sendo realizada, visto sua maior sensibilidade, conforme reportado neste trabalho. Este estudo também reforça a importância de se considerar as macrófitas aquáticas em estudos ecotoxicológicos, uma vez que as mesmas têm importante papel na estruturação e nos mecanismos de funcionamento dos ambientes aquáticos, sendo responsáveis por diversas funções e serviços ecossistêmicos.

### **9.1 O uso dos modelos ecossistêmicos para avaliação dos efeitos de agrotóxicos em ecossistemas aquáticos**

Ambos os experimentos realizados em mesocosmos permitem inferir sobre a importância do uso de um cenário experimental mais próximo à realidade, considerando, neste caso, os efeitos diretos e indiretos que atuam não somente sobre uma ou outra comunidade, mas sim em um nível de organização biológica maior, no caso, um modelo

de ecossistema. Ou seja, os efeitos nas macrófitas, incluindo redução da biomassa, crescimento da raiz e sobrevivência/mortalidade, também contribuem para que outras comunidades sejam diretas ou indiretamente afetadas, como no caso da fauna associada de macroinvertebrados, avaliada nesta pesquisa, que pode utilizar as plantas como refúgio, alimento ou habitat para colonização. No presente estudo, as espécies *P. stratiotes* e *E. crassipes*, bem como as comunidades de macroinvertebrados aquáticos, foram afetadas pela presença do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil, isolados e em mistura, bem como pela presença da vinhaça, a qual se mostrou com efeito mais severo sobre a sobrevivência das plantas e, conseqüentemente, da fauna associada. Em relação à pesquisa realizada em espécies típicas de clima temperado, verificou-se que *M. spicatum* também foi afetada pela exposição ao 2,4-D, uma vez que o herbicida é uma auxina sintética, um hormônio vegetal muito eficaz contra infestantes dicotiledôneas. Embora a *G. maxima* não tenha apresentado nenhum efeito negativo após exposição ao herbicida, o presente experimento contribuiu para avaliar o protocolo de teste que estava em desenvolvimento, assim como para *Lemna minor* e o *Myriophyllum spicatum*.

Os resultados permitem ainda levantar a discussão acerca das práticas de manejo utilizadas no cultivo de cana-de-açúcar no Brasil, como uso e aplicação de agrotóxicos (como fipronil e 2,4-D) e de fertilizantes (como a vinhaça). Importante ainda enfatizar que no ano de 2021 o governo brasileiro aprovou mais de 500 novos registros de agrotóxicos no país, o que associado à falta de investimento nas agências ambientais para avaliação e aprovação desses produtos no Brasil (IEA, 2021), contribui para o aumento de risco ecológico em diversos ecossistemas.

## **10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Automatic citation updates are disabled. To see the bibliography, click Refresh in the Zotero tab.

## Apêndice

- 1) Experimentos laboratoriais
  - a. *L. punctata*
  - b. *M. aquaticum*
- 2) Modelos ecossistêmicos em clima tropical (Itirapira – SP, Brasil)
  - c. *P. stratiotes* e fauna de macroinvertebrados
  - d. *E. crassipes* e fauna de macroinvertebrados
- 3) Modelos ecossistêmicos em clima temperado (Renkun, Países Baixos)
  - e. *M. spicatum*
  - f. *G. maxima*
  - g. Macroinvertebrados
  - h. Zooplânctons