

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

ALLAN PRETTI OGURA

**FITOTOXICIDADE E FITORREMEDIAÇÃO DE ÁGUA E SOLOS
CONTAMINADOS COM OS AGROTÓXICOS 2,4-D E FIPRONIL APLICADOS NO
CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

São Carlos – São Paulo

2022

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

ALLAN PRETTI OGURA

**Fitotoxicidade e fitorremediação de água e solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D
e fipronil aplicados no cultivo de cana-de-açúcar**

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

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos – 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).

O35f Ogura, Allan Pretti
Fitotoxicidade e fitorremediação de água e solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil aplicados no cultivo de cana-de-açúcar / Allan Pretti Ogura; orientador Evaldo Luiz Gaeta Espíndola. 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. Ecotoxicidade. 2. Ecotoxicologia. 3. Bioacumulação. 4. Bioindicadores. 5. Recuperação de Áreas Degradadas. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **ALLAN PRETTI OGURA**.

Título da tese: "Fitotoxicidade e fitorremediação de água e solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil aplicados no cultivo de cana-de-açúcar".

Data da defesa: 18/10/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

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

Aprovado

Profa. Dra. **Cassiana Carolina Montagner Raimundo**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovado

Profa. Dra. **Ana Letícia Madeira Sanches**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Registro)

Aprovado

Profa. Dra. **Patricia Carla Giloni de Lima**

(Universidade Estadual do Centro-Oeste/UNICENTRO)

Aprovado

Dra. **Maria Edna Tenório Nunes**

(Pesquisadora CRHEA/EESC-USP)

Aprovado.

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**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Evaldo Luíz Gaeta Espíndola, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo [EESC – USP], pela colaboração em todas as fases da pesquisa, com conselhos e sugestões que contribuíram com o desenvolvimento da Tese. Em especial, gostaria de agradecer todo o apoio, confiança, suporte, conversas e, principalmente, pela amizade construída ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Ana Leticia Madeira Sanches, da Universidade Estadual Paulista [Unesp], Campus Registro, à Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas [IQ – Unicamp], à Dra. Maria Edna Tenório Nunes, da EESC – USP e à Profa. Dra. Patricia Carla Giloni de Lima, da Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro – Guarapuava), membros da Banca Avaliadora da Tese de Doutorado, por terem aceitado o convite, pela disponibilidade para leitura da tese e por todas as contribuições feitas.

À Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner, do IQ – Unicamp, e ao Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha, do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC – USP, pelas contribuições durante a participação na banca do Exame de Qualificação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq], pela bolsa de doutorado concedida (nº 140411/2018-6), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [CAPES], pela bolsa complementar durante parte do período de prorrogação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [FAPESP], pelo suporte financeiro no Projeto Temático nº 2015/18790-3 “*Environmental effects of the pasture-sugarcane conversion and pasture intensification*”, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Antônio Martinelli, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" [ESALQ – USP].

À MSc. Mariana Amaral Dias, do Laboratório de Química Ambiental do IQ – Unicamp, por toda a colaboração nas análises químicas das amostras de água, solo e plantas, com supervisão e apoio da Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner.

À MSc. Jacqueline Zanin Lima, do Departamento de Geotecnia da EESC – USP, pela colaboração nos experimentos e com as análises do solo utilizado no estudo, com supervisão e apoio da Profa. Dra. Valéria Guimarães Silvestre Rodrigues.

Aos pesquisadores do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada [NEEA – USP], em especial à Laís Silva, pela amizade construída nesses anos, por toda a ajuda nos trabalhos e por todos os rolês certos e errados, mesmo quando eu me esqueci de você. Ao Thandy Pinto, por ter me acolhido no laboratório, me ajudado em diversas ocasiões e pelas discussões dos projetos e trabalhos. À Raquel Moreira e à Juliane Freitas, pelo exemplo e pelas contribuições na pesquisa e no Projeto Temático. Agradeço por sempre estarem à disposição para ajudar e solucionar as dúvidas desta pesquisa e de outros trabalhos.

Aos demais companheiros de laboratório, Ana Leticia Sanches, Carina Cotta, David Alexandre, Dayane Oliveira, Diego Silva, Elisabete do Nascimento, Giseli Rocha, Isabele Freitas, Lais Lopes, Laís Giroto, Livia Pitombeira, Lucas Lopes, Maria Carolina Triques, Marina Reghini, Obede Alves e Vanessa Oliveira, pela boa convivência e colaboração com os trabalhos.

Aos meus alunos de iniciação científica Giovana Negro, Lívia Pereira, Isis Marestoni, Luís Fernando de Britto, Vitor Vitrio, Andrêina da Silva, Victor Rodrigues, Giovana Cassimiro e Matheus Rezende, que tanto contribuíram para meu aprendizado e que compartilharam bons momentos.

Aos demais alunos de iniciação científica que participaram da equipe do NEEA nesse período, Ana Beatriz dos Santos, Bruna Moruzzi, Caroline Mathi, Catarina Sampaio, Danilo

Athayde, Fernanda Pintucci, Lais Sorigotto, Leandro Kato, Natália Cardoso, Natália Windmöller, Priscille Dreux, Vanessa Costa e Victor Rolim.

Ao Amândio Menezes Nogueira, pela participação no cultivo dos cladóceros nas etapas iniciais da pesquisa e por ter contribuído com a manutenção do laboratório. Ao Marcelo Menezes Nogueira, pelo auxílio nas análises de nutrientes e metais.

À Aline Bernegossi, pela parceria em diversos trabalhos desde a graduação, em especial pela divulgação científica no @amb.ciencia e pelo companheirismo na pesquisa e na vida. Aos demais pesquisadores do grupo do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos [LEAA – USP], Gleyson Borges, Mayara Felipe e Mara Silva, pela colaboração em trabalhos e discussões. Ao Lucas Massaro, à Jéssica Marques e à Liliane Trindade, pelas discussões acadêmicas, parceria nos artigos e revisões.

À Dra. Clarice Maria Rispoli Botta e à Dra. Maria Edna Tenório Nunes, pela colaboração desde o começo do doutorado, durante as disciplinas de “Fundamentos de Toxicologia Ambiental com Ênfase em Ecotoxicologia Aquática” e “Ecotoxicologia Terrestre e Avaliação de Risco Ecológico”.

Ao José Luis e Nelson do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental [PPG – SEA], pelo suporte administrativo durante o período de doutorado.

Aos alunos, ex-alunos, professores e funcionários do curso de Engenharia Ambiental da EESC – USP, que estiveram comigo em diversos momentos, com os quais aprendi bastante.

Aos meus alunos do Projeto Aprender, além dos demais voluntários, que participaram do meu crescimento como professor da disciplina de Geografia por cinco anos.

Aos alunos do curso de Engenharia Civil da Unesp Campus Ilha Solteira, com os quais pude compartilhar a minha primeira experiência como docente em uma universidade pública, nas disciplinas de “Sistemas de Abastecimento de Água e Esgoto” e “Instalações Prediais Hidráulicas, Sanitárias e Gás”.

Aos colegas dos MBAs em “Agronegócios” e “Gestão de Áreas Contaminadas”, em especial à Jacqueline Lima e à Liliane Trindade, com quem pude aprender e trocar experiências durante o período do doutorado.

Aos amigos do Povo e da Amb010, em especial à Michelle Kanashiro, por sempre acreditarem em mim, participarem de vários momentos incríveis e pela alegria que trouxeram na minha vida desde a graduação.

Aos amigos do vôlei, por todos os momentos e rolês errados. Ao Fellipe Moutinho, pelo drama e por estar comigo em todos os momentos (até demais). À Bianca Queiroz, ao Murillo Gregório, ao Gabriel Picolo e ao Thiago Kelvin, pela companhia e eventos (nem tão) *fitness*. À Maiara Oliveira, pelas corridas e por ter inventado o distanciamento social.

A todos os professores que fizeram parte da minha vida, que ajudaram no meu crescimento e que foram exemplos profissionais. Aos demais professores e alunos com os quais tive contato durante o período de doutorado, pela troca de experiências e ideias que foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional, dentro e fora da universidade.

Aos meus pais, Luiz Ogura e Christina Pretti, e às minhas irmãs, Luiza Ogura e Tielly Ogura, pelo amor em meio ao caos, pela bagunça, pelo apoio de sempre e por acreditarem em mim mesmo nos momentos nos quais eu não acreditei.

“Taking on a challenge is a lot like riding a horse, isn’t it? If you’re comfortable while you’re doing it, you’re probably doing it wrong.”

Ted Lasso

RESUMO

OGURA, A. P. **Fitotoxicidade e fitorremediação de água e solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil aplicados no cultivo de cana-de-açúcar.** 2022. 171 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

A expansão de áreas de cultivo de cana-de-açúcar está associada ao uso de agrotóxicos, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o fipronil. Esses contaminantes ocasionam riscos a plantas aquáticas e terrestres, além de outros organismos. Nesse contexto, a fitorremediação se apresenta como uma alternativa para redução da ecotoxicidade, utilizando plantas nativas, com ciclo vegetativo rápido e facilidade no plantio e remoção. A presente tese visou à avaliação da fitotoxicidade em plantas aquáticas e terrestres expostas ao 2,4-D e ao fipronil, isolados e em mistura, e à aplicação da fitorremediação de águas e solos contaminados em escala laboratorial. Os ensaios de fitotoxicidade foram feitos com três plantas terrestres (*Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab* e *Lupinus albus*) e três plantas aquáticas (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia auriculata*). O 2,4-D foi o principal responsável pela fitotoxicidade em plantas terrestres, mesmo na menor concentração testada ($60 \mu\text{g kg}^{-1}$), ocasionando principalmente a redução do tamanho das raízes. Esse herbicida causou efeitos de toxicidade para as plantas aquáticas apenas nas maiores concentrações ($445,4 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto o mesmo não foi observado para o fipronil às plantas terrestres e aquáticas (até $120 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $113,9 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). A mistura dos agrotóxicos não apresentou efeitos de sinergismo ou antagonismo para os dois grupos de plantas, sendo que a fitotoxicidade observada foi decorrente das concentrações de 2,4-D. Dessa forma, resíduos de agrotóxicos no solo e na água, especialmente o 2,4-D, podem comprometer o desenvolvimento de espécies vegetais em cultivos de áreas adjacentes à cana-de-açúcar. Os ensaios de fitorremediação foram feitos com três plantas terrestres (*C. ensiformis*, *Mucuna pruriens* e *D. lablab*) para $23,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ de 2,4-D e $20,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de fipronil durante 30 dias e três plantas aquáticas (*E. crassipes*, *P. stratiotes* e *S. auriculata*) para $158,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D e $32,6 \mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil durante 7 dias. Nos dois cenários, as plantas não foram capazes de reduzir as concentrações dos agrotóxicos de forma significativa, o que pode ter sido decorrente do reduzido tempo de contato ou pelas condições experimentais não favoráveis (e.g., pH). Além disso, a elevada persistência do fipronil (e.g., baixa solubilidade de $1,9$ a $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ e coeficiente de adsorção de 825 a 6863 , que confere afinidade à matéria orgânica) pode ter dificultado a fitorremediação. A quantificação dos contaminantes na parte aérea e nas raízes das plantas determinou o potencial de translocação e bioacumulação no tecido vegetal. Houve bioacumulação de fipronil nas raízes e parte aérea das plantas terrestres, mas o mesmo não ocorreu para o 2,4-D, que pode ter sido degradado antes da acumulação (tempo de meia vida de 7 a 14 dias). Em plantas aquáticas, os dois agrotóxicos foram bioacumulados, especialmente nas raízes, indicando potencial para fitorremediação. Porém, as plantas devem ser destinadas de forma adequada para que os resíduos de agrotóxicos não causem impactos na cadeia trófica por meio da biomagnificação. Mesmo após a fitorremediação, organismos bioindicadores foram sensíveis quando expostos às amostras de solo e água, em especial os testes de germinação com a planta *Eruca sativa* L. para o 2,4-D e, para o fipronil, os cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia similis*, além da larva do inseto *Chironomus sancticaroli*. Portanto, há a necessidade de mais estudos para investigar o potencial de fitorremediação desses contaminantes em águas e solos, aumentando o período de exposição e a escala dos experimentos, além da combinação de diferentes espécies de plantas com outras estratégias de remediação de áreas contaminadas.

Palavras-chave: Ecotoxicidade; Ecotoxicologia, Bioacumulação, Bioindicadores, Recuperação de Áreas Degradadas.

ABSTRACT

OGURA, A. P. **Phytotoxicity and phytoremediation of water and soil contaminated with the pesticides 2,4-D and fipronil applied to sugarcane cultivation.** 2022. 171 p. Thesis (Ph.D. degree). São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2022.

The expansion of sugarcane cultivation areas is associated with pesticide application, such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and fipronil. These contaminants pose risks to aquatic and terrestrial plants and other organisms. In this context, phytoremediation presents itself as an alternative to reduce ecotoxicity, using native plants with a fast vegetative cycle and easy planting and removal. The present thesis aimed to evaluate the phytotoxicity in aquatic and terrestrial plants exposed to 2,4-D and fipronil, isolated and in a mixture, and to apply phytoremediation of contaminated waters and soils on a laboratory scale. Phytotoxicity tests were carried out with three land plants (*Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab*, and *Lupinus albus*) and three aquatic plants (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, and *Salvinia auriculata*). 2,4-D was the main responsible for phytotoxicity in terrestrial plants, even at the lowest concentration tested ($60 \mu\text{g kg}^{-1}$), causing mainly a reduction in the size of the roots. However, this herbicide caused toxicity effects for aquatic plants only at the highest concentrations ($445.4 \mu\text{g L}^{-1}$), while the same was not observed for fipronil in terrestrial and aquatic plants tested (up to $120 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $113.9 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively). The mixture of pesticides did not present synergistic, or antagonism effects for the two groups of plants, and the phytotoxicity observed was due to the concentrations of 2,4-D. Thus, pesticide residues in soil and water, especially 2,4-D, can compromise the development of plant species in crops adjacent to sugarcane. Phytoremediation assays were performed with three terrestrial plants (*C. ensiformis*, *Mucuna pruriens*, and *D. lablab*) for $23.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ of 2,4-D and $20.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ of fipronil for 30 days, and three aquatic plants (*E. crassipes*, *P. stratiotes*, and *S. auriculata*) for $158.2 \mu\text{g L}^{-1}$ of 2,4-D and $32.6 \mu\text{g L}^{-1}$ of fipronil for seven days. In both scenarios, plants could not significantly reduce pesticide concentrations, which may have been due to the reduced contact time or unfavorable experimental conditions (e.g., pH). Furthermore, the high persistence of fipronil (e.g., the low solubility of 1.9 to 2.4 mg L^{-1} and adsorption coefficient of 825 to 6863, which confers affinity to organic matter) may have hampered phytoremediation. The quantification of contaminants in the shoots and roots of plants determined the potential for translocation and bioaccumulation in plant tissue. Fipronil bioaccumulation occurred in the roots and shoots of terrestrial plants, but the same did not happen for 2,4-D, which may have been degraded before accumulation (half-life from 7 to 14 days). In aquatic plants, the two pesticides were bioaccumulated, especially in the roots, indicating a potential for phytoremediation. However, plants must be properly disposed of so that pesticide residues do not impact the food chain through biomagnification. Even after phytoremediation, bioindicator organisms were sensitive when exposed to soil and water samples, especially germination tests with the plant *Eruca sativa* L. for 2,4-D and fipronil, the cladocerans *Ceriodaphnia silvestrii*, *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia similis*, in addition to the larvae of the insect *Chironomus sancticaroli*. Therefore, there is a need for further studies to investigate the phytoremediation potential of these contaminants in water and soil, increasing the exposure period and scale of experiments and combining different plant species with other remediation strategies for contaminated areas.

Keywords: Ecotoxicity, Ecotoxicology, Bioaccumulation, Bioindicators, Recovery of Degraded Areas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físicas e químicas dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil (Adaptado de KIM et al. (2021)).	16
Tabela 2 – Estudos envolvendo fitorremediação de solos contaminados com agrotóxicos. ...	22
Tabela 3 – Estudos envolvendo fitorremediação de águas contaminadas com agrotóxicos....	24
Tabela 4 – Preparo da solução nutritiva de Hoagland e Arnold (1950).	28
Tabela 5 – Composição da fase móvel aquosa e orgânica do método cromatográfico para o modo de ionização negativo.	30
Tabela 6 – Parâmetros da espectrometria de massas para os compostos analisados.	31
Tabela 7 – Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e coeficiente de determinação (R^2) para os analitos.	31
Tabela 8 – Informações sobre as sementes obtidas do fornecedor (Piraí Sementes®), em relação à germinação, pureza, profundidade de semeadura, época ideal de plantio e produção de biomassa e nitrogênio.	33
Tabela 9 – Caracterização do solo coletado na área do NEEA/CRHEA/EESC/USP.	47
Tabela 10 – Parâmetros físicos e químicos na água coletada no poço do CRHEA/EESC/USP e da água utilizada para o cultivo e ensaios com cladóceros utilizados na presente pesquisa. ..	48
Tabela 11 – Crescimento inicial (CI), biomassa fresca (BF) e biomassa seca (BS) da parte aérea e das raízes das plantas <i>Cajanus cajan</i> , <i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Crotalaria juncea</i> , <i>Dolichos lablab</i> , <i>Lupinus albus</i> , <i>Mucuna aterrima</i> , <i>Mucuna pruriens</i> e <i>Raphanus sativus</i> expostas a 4,7 mg kg ⁻¹ de 2,4-D em relação à condição não contaminada (controle).	49
Tabela 12 – Índice de tolerância (IT) para crescimento inicial (CI) e biomassa fresca (BF) e biomassa seca (BS) das plantas <i>Cajanus cajan</i> , <i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Crotalaria juncea</i> , <i>Dolichos lablab</i> , <i>Lupinus albus</i> , <i>Mucuna aterrima</i> , <i>Mucuna pruriens</i> e <i>Raphanus sativus</i> expostas a 4,7 mg kg ⁻¹ de 2,4-D em relação à condição não contaminada (controle).	50

Tabela 13 – Concentração dos agrotóxicos e dos subprodutos nas amostras de solo utilizadas para os ensaios de fitotoxicidade de plantas terrestres expostas à mistura dos contaminantes.	52
Tabela 14 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas <i>Canavalia ensiformis</i> expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e tamanho da raiz. .	55
Tabela 15 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas <i>Canavalia ensiformis</i> expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando biomassa fresca e seca da parte aérea e da raiz.	56
Tabela 16 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas <i>Dolichos lablab</i> expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e tamanho da raiz.....	59
Tabela 17 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas <i>Dolichos lablab</i> expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando biomassa fresca e seca da parte aérea e da raiz.....	60
Tabela 18 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas <i>Lupinus albus</i> expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e tamanho da raiz.....	63
Tabela 19 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas <i>Lupinus albus</i> expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando biomassa fresca e seca da parte aérea e da raiz.....	64
Tabela 20 – Aumento percentual (%) do número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca no ensaio de fitotoxicidade das plantas aquáticas <i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Pistia stratiotes</i> e <i>Salvinia auriculata</i> expostas a diferentes concentrações de 2,4-D após 7 dias.....	80
Tabela 21 – Concentrações nas amostras de solo analisadas após o experimento de fitorremediação de solos contaminados com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 30 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com <i>Canavalia ensiformis</i> (PT1), <i>Mucuna pruriens</i> (PT2) e <i>Dolichos lablab</i> (PT3).	85

Tabela 22 – Concentrações dos agrotóxicos acumulados nas amostras de parte aérea (PA) e raiz (R) de *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3), após o experimento de fitorremediação de solos contaminados com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 30 dias.....87

Tabela 23 – Fator de bioconcentração (FBC), fator de bioacumulação (FBA) e fator de translocação (FT) para os agrotóxicos acumulados nas amostras de *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3), após o experimento de fitorremediação de solos contaminados com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 30 dias.....88

Tabela 24 – Ensaio de ecotoxicidade para avaliação da germinação de sementes de *Eruca sativa* L. expostas às amostras de elutriado feito com o solo do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 30 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3).90

Tabela 25 – Parâmetros físicos e químicos, incluindo pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido, ao final do experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias, considerando os tratamentos com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).99

Tabela 26 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca das macrófitas no início e ao final do experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias, considerando os tratamentos com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3). 100

Tabela 27 – Concentrações de agrotóxicos obtidas nas amostras de água analisadas após o experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3). 102

Tabela 28 – Concentrações dos agrotóxicos acumulados nas amostras de parte aérea (A) e raiz (R) de *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3), após o

experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias..... 103

Tabela 29 – Fator de bioconcentração (FBC), fator de bioacumulação (FBA) e fator de translocação (FT) para os agrotóxicos acumulados nas amostras de *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3), após o experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias. 104

Tabela 30 – Ensaio de ecotoxicidade para avaliação da germinação de sementes de *Eruca sativa* L. expostas às amostras de água após o experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3). 106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expansão do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil (entre 1961 e 2019), considerando o aumento de área cultivada (ha) e de produtividade (x1000 t). (Adaptado de OGURA et al., 2022b).	8
Figura 2 – Uso e ocupação do solo no estado de São Paulo em 1999 e 2019 por região administrativa: Áreas de cultivo de cana-de-açúcar e pastagens (Adaptado de OGURA et al., 2022b).	10
Figura 3 – Fórmula estrutural do 2,4-D e dos seus principais produtos de degradação, incluindo o 2,4-Diclorofenol, 4-clorofenol e 2,4-dicloro-1-metoxibenzeno (Adaptado de KIM et al. (2021)).	13
Figura 4 – Fórmula estrutural do fipronil e principais rotas de degradação para os metabólitos sulfona (oxidação), sulfeto (redução), amida (hidrólise) e desulfinil (fotólise) (Adaptado de SINGH et al. (2021)).	15
Figura 5 – Desenho experimental e visão geral da presente pesquisa, considerando os tratamentos controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F) e mistura 1:1 dos agrotóxicos (M) com as espécies de plantas terrestres (PT) <i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Dolichos lablab</i> , <i>Lupinus albus</i> e <i>Mucuna pruriens</i> e as espécies de plantas aquáticas (PA) <i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Pistia stratiotes</i> e <i>Salvinia auriculata</i>	26
Figura 6 – Disposição das sementes de <i>Cajanus cajan</i> (A), <i>Canavalia ensiformis</i> (B), <i>Crotalaria juncea</i> (C), <i>Dolichos lablab</i> (D), <i>Lupinus albus</i> (E), <i>Mucuna aterrima</i> (F), <i>Mucuna pruriens</i> (G) e <i>Raphanus sativus</i> (H).	34
Figura 7 – Plantio das dez sementes (A), emergência das plantas (B) e disposição aleatória do experimento (C) de fitotoxicidade com <i>Dolichos lablab</i> das amostras de solo contaminados com fipronil, 2,4-D e mistura.	35
Figura 8 – Plantas aquáticas utilizadas na presente pesquisa, incluindo <i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Pistia stratiotes</i> e <i>Salvinia auriculata</i>	37
Figura 9 – Desenho experimental dos ensaios de fitorremediação de solos contaminados, considerando três plantas terrestres. Os tratamentos avaliados, com quatro réplicas, foram o controle, o 2,4-D, o fipronil e a mistura dos dois agrotóxicos (proporção 1:1).	42

Figura 10 – Preparo do elutriato 1:4 (A) e disposição das amostras para ensaios ecotoxicológicos com <i>C. sancticaroli</i> (B) após experimento de fitorremediação.	43
Figura 11 – Desenho experimental dos ensaios de fitorremediação de águas contaminadas, considerando três plantas aquáticas. Os tratamentos avaliados, com quatro réplicas, foram o controle, o 2,4-D, o fipronil e a mistura dos dois agrotóxicos (proporção 1:1).....	45
Figura 12 – Análise granulométrica do solo de estudo, conforme a porcentagem que passa (%) pelas peneiras estabelecidas pela NBR 5734/80 (ABNT, 1980).	48
Figura 13 – Vista frontal e superficial das unidades experimentais (controle e com 4,7 mg kg ⁻¹ de 2,4-D) para avaliação do crescimento inicial de <i>Cajanus cajan</i> (A), <i>Canavalia ensiformis</i> (B), <i>Crotalaria juncea</i> (C), <i>Dolichos lablab</i> (D), <i>Lupinus albus</i> (E), <i>Mucuna aterrima</i> (F), <i>Mucuna pruriens</i> (G) e <i>Raphanus sativus</i> (H).	51
Figura 14 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas <i>Canavalia ensiformis</i> quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura, com destaque para a disposição dos experimentos (A), visão geral com um pote de cada tratamento com 2,4-D isolado (n = 6) (B) e uma planta representativa de cada tratamento com diferentes concentrações de 2,4-D (C).	53
Figura 15 – Crescimento inicial da parte aérea e da raiz de plantas <i>Canavalia ensiformis</i> no ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil de forma isolada.	54
Figura 16 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas <i>Dolichos lablab</i> quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura, com destaque para a disposição dos experimentos (A), visão geral com um pote de cada tratamento (n = 36) (B) e uma planta representativa de cada tratamento com diferentes concentrações de 2,4-D (C).	57
Figura 17 – Crescimento inicial da parte aérea e da raiz de plantas <i>Dolichos lablab</i> no ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil de forma isolada.	58
Figura 18 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas <i>Lupinus albus</i> quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil em diferentes proporções	

de mistura, com destaque para a disposição dos experimentos (A), visão geral com um pote de cada tratamento (n = 36) (B) e uma planta representativa de cada tratamento com diferentes concentrações de 2,4-D (C).....61

Figura 19 – Crescimento inicial da parte aérea e da raiz de plantas *Lupinus albus* no ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil de forma isolada.62

Figura 20 – Porcentagem de inibição (%) de crescimento da parte aérea e da raiz de plantas *Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab* e *Lupinus albus* no ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial quando expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36).....66

Figura 21 – Destaque para as diferenças entre as raízes das plantas *Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab* e *Lupinus albus* presentes nos tratamentos sem contaminação (A, D e G) em comparação com as concentrações de 2,4-D intermediárias (B, E e H) e máximas (C, F e I) testadas.....67

Figura 22 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Eichhornia crassipes* exposta a 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.....72

Figura 23 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Pistia stratiotes* exposta a 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.73

Figura 24 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Salvinia auriculata* exposta a 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.74

Figura 25 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Eichhornia crassipes* exposta a diferentes concentrações de 2,4-D.75

Figura 26 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Pistia stratiotes* exposta a diferentes concentrações de 2,4-D.76

Figura 27 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de <i>Salvinia auriculata</i> exposta a diferentes concentrações de 2,4-D.	78
Figura 28 – Comparação visual do ensaio de fitotoxicidade das plantas aquáticas <i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Pistia stratiotes</i> e <i>Salvinia auriculata</i> expostas a diferentes concentrações de 2,4-D após 7 dias.	81
Figura 29 – Ensaio de ecotoxicidade para avaliação da germinação de sementes de <i>Eruca sativa</i> L. expostas às amostras de elutriado feito com o solo do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 30 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com <i>Canavalia ensiformis</i> (PT1), <i>Mucuna pruriens</i> (PT2) e <i>Dolichos lablab</i> (PT3).	91
Figura 30 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de <i>Daphnia similis</i> expostos às amostras de elutriado do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com <i>Canavalia ensiformis</i> (PT1), <i>Mucuna pruriens</i> (PT2) e <i>Dolichos lablab</i> (PT3).	92
Figura 31 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de <i>Ceriodaphnia dubia</i> expostos às amostras de elutriado do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com <i>Canavalia ensiformis</i> (PT1), <i>Mucuna pruriens</i> (PT2) e <i>Dolichos lablab</i> (PT3).	93
Figura 32 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> expostos às amostras de elutriado do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com <i>Canavalia ensiformis</i> (PT1), <i>Mucuna pruriens</i> (PT2) e <i>Dolichos lablab</i> (PT3).	94
Figura 33 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (96 h) com larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> expostos às amostras de elutriado do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com <i>Canavalia ensiformis</i> (PT1), <i>Mucuna pruriens</i> (PT2) e <i>Dolichos lablab</i> (PT3).	95
Figura 34 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (96 h) com larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> utilizando as amostras de solo como sedimento após o ensaio de fitorremediação de 2,4-D e	

fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3).....96

Figura 35 – Ensaio de ecotoxicidade para avaliação da germinação de sementes de *Eruca sativa* L. expostas às amostras de água após o experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3). 107

Figura 36 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Daphnia similis* expostos às amostras de água do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3). 109

Figura 37 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Ceriodaphnia dubia* expostos às amostras de água do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3). 110

Figura 38 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (96 h) com larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas às amostras de água do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3). 111

Figura 39 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos às amostras de água do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3). 113

Figura 40 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos às diferentes diluições das amostras de água do experimento de fitorremediação de fipronil, considerando tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3). 114

Figura 41 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos às diferentes diluições das amostras de água do experimento de fitorremediação das

misturas de fipronil e 2,4-D, considerando tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).....115

Figura 42 – Ensaio de ecotoxicidade crônica (8 dias) com neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos às diferentes diluições das amostras de água do experimento de fitorremediação controle e com 2,4-D, considerando tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA: Análise de variância

BF: Biomassa fresca

BIOTACE: Laboratório de Biotoxicologia em Águas Continentais e Efluentes

BS: Biomassa seca

C: Tratamento controle não contaminado

CAS: Chemical Abstracts Service

CENO: Concentração de Efeito Não-Observado

CEO: Concentração de Efeito Observado

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CI: Crescimento inicial

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

CP_{aérea}: Concentração de uma substância ou composto na parte aérea da planta

CP_{raiz}: Concentração de uma substância ou composto nas raízes da planta

CRHEA: Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais

CTC: Capacidade de Troca Catiônica

D: Tratamento com o herbicida 2,4-D isolado

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio

CE₁₀: Concentração que causa 10% do efeito na população

CE₂₀: Concentração que causa 20% do efeito na população

CE₅₀: Concentração que causa 50% do efeito na população

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EESC: Escola de Engenharia de São Carlos

Eh: Potencial de oxirredução

F: Tratamento com o inseticida fipronil isolado

FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Fipronil: 5-amino-3-cyano-1-(2,6-dichloro-4-trifluoromethyl-phenyl)-4-trifluoromethyl sulfinyl pyrazole

FBA: Fator de Bioacumulação

FBC: Fator de bioconcentração

FT: Fator de Translocação

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GEE: Gases de efeito estufa

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISO: do inglês, *International Organization for Standardization*

IT: Índice de Tolerância

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

Koc: Coeficiente de adsorção

Kow: Coeficiente de partição n-octanol-água

LC-MS/MS: Cromatografia líquida-espectrometria de massa

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

LQA: Laboratório de Química Ambiental

M: Tratamento de mistura dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil (1:1)

NEEA: Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada

NPK: nitrogênio-fósforo-potássio

PA1: Planta Aquática 1 (*Eichhornia crassipes*)

PA2: Planta Aquática 2 (*Pistia stratiotes*)

PA3: Planta Aquática 3 (*Salvinia auriculata*)

pH: potencial hidrogeniônico

PEC: do inglês, *Predicted Environmental Concentrations* (concentrações ambientais previstas)

pKa: coeficiente de dissociação

PPG-SEA: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental

Proálcool: Programa Brasileiro do Alcool

PSA: do inglês, *primary secondary amine*

PT1: Planta Terrestre 1 (*Canavalia ensiformis*)

PT2: Planta Terrestre 2 (*Mucuna pruriens*)

PT3: Planta Terrestre 3 (*Dolichos lablab*)

PTFE: Politetrafluoretileno

QuEChERS: do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

R²: coeficiente de determinação

rpm: Rotações por minuto

SP: Tratamento sem planta (controle-negativo)

USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

USP: Universidade de São Paulo

OD: Oxigênio dissolvido

LISTA DE SÍMBOLOS

CaCO₃: Carbonato de cálcio

Ca(NO₃)₂: Nitrato de cálcio

CO₂: Gás carbônico

CuCl₂: Cloreto de cobre

FeCl₂: Cloreto de ferro (II)

H₂MoO₄: Ácido molibdico

H₂O: Água

H₃BO₃: Ácido bórico

KCl: Cloreto de potássio

KH₂PO₄: Fosfato monopotássico

KNO₃: Nitrato de potássio

MgSO₄: Sulfato de magnésio

MnCl₂: Cloreto de manganês

N₂: Nitrogênio

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NH₄OH: Hidróxido de amônio

O₂: Oxigênio

ZnCl₂: Cloreto de zinco

Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. APRESENTAÇÃO DA TESE.....	4
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS PROPOSTOS.....	6
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
4.1. Cana-de-açúcar.....	8
4.2. Agrotóxicos 2,4-D e fipronil.....	13
4.3. Ecotoxicidade dos agrotóxicos.....	16
4.4. Fitorremediação.....	18
4.4.1. Fitorremediação de agrotóxicos com plantas terrestres.....	21
4.4.2. Fitorremediação de agrotóxicos com plantas aquáticas.....	23
5. MÉTODOS E ETAPAS DA PESQUISA.....	25
5.1. Caracterização das matrizes estudadas.....	27
5.1.1. Coleta e caracterização do solo.....	27
5.1.2. Preparo e caracterização da água de estudo.....	27
5.2. Agrotóxicos.....	28
5.2.1. Análises de agrotóxicos em amostras de solo e água.....	29
5.2.2. Análises de agrotóxicos em amostras de plantas.....	31
5.3. Fitotoxicidade dos agrotóxicos em plantas terrestres.....	32
5.4. Fitotoxicidade dos agrotóxicos em plantas aquáticas.....	36
5.5. Organismos bioindicadores.....	37
5.5.1. Cultivo da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i>	38
5.5.2. Cladóceros: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Daphnia similis</i>	39
5.5.3. <i>Chironomus sancti-caroli</i>	40
5.5.4. Germinação de sementes: <i>Eruca sativa</i> L.	41
5.6. Fitorremediação de solos contaminados com agrotóxicos.....	41
5.7. Fitorremediação de águas contaminadas com agrotóxicos.....	44

5.8. Análise dos dados.....	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.1. Caracterização das matrizes estudadas.....	47
6.2. Fitotoxicidade dos agrotóxicos em plantas terrestres.....	49
6.2.1. Ensaios preliminares com o herbicida 2,4-D.....	49
6.2.2. Ensaios de fitotoxicidade com os agrotóxicos em mistura.....	52
6.3. Fitotoxicidade dos agrotóxicos em plantas aquáticas	71
6.4. Fitorremediação de solos contaminados com agrotóxicos.....	85
6.5. Fitorremediação de águas contaminadas com agrotóxicos	98
6.6. Aplicabilidade da fitorremediação no contexto da cana-de-açúcar	118
7. CONCLUSÕES	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O aumento da demanda e dos preços dos combustíveis fósseis tem incentivado o uso de alternativas, incluindo os biocombustíveis (e.g., etanol e biodiesel). Na década de 1970, o Programa Brasileiro do Álcool [Proálcool] subsidiou a produção de etanol, promovendo a redução da dependência de combustíveis fósseis (CREMONEZ et al., 2015). A produção brasileira de cana-de-açúcar vem crescendo principalmente devido à ampla área destinada às atividades agrícolas, condições climáticas favoráveis e disponibilidade hídrica (HIRA e DE OLIVEIRA, 2009; PINTO et al., 2005). A cana-de-açúcar é uma cultura altamente relevante nas exportações nacionais, pois seus principais produtos (i.e., etanol e açúcar) estão entre os mais comercializados, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento [CONAB] (CONAB, 2020). Diante da competitividade com a produção de alimentos, a expansão agrícola deve ser incentivada sem que haja avanço do desmatamento em áreas preservadas, o que pode ser feito por meio de alterações nas formas de uso e ocupação do solo (DEFANTE et al., 2018; FERREIRA FILHO e HORRIDGE, 2014; HOGARTH, 2017). Nesse contexto, o processo de conversão de pastagens subutilizadas em áreas de cultivo de cana-de-açúcar apresenta-se como uma alternativa viável (BORDONAL et al., 2018; LOSSAU et al., 2015; LOURENZANI et al., 2014).

No entanto, solos cultivados para monocultura de cana-de-açúcar estão sujeitos a mudanças físicas significativas (e.g., alteração da porosidade) por máquinas pesadas, que promovem a compactação do solo e, por consequência, reduzem a permeabilidade (MARTINELLI e FILOSO, 2008). A desagregação do material não consolidado e a erosão contribuem para a perda de nutrientes e carbono na camada superficial do solo, diminuindo a fertilidade e aumentando a demanda por insumos químicos (BORRELLI et al., 2020). Além disso, outros impactos ambientais estão presentes no ciclo de vida do produto, como a contaminação do solo, da água (i.e., água subterrânea e água doce) e do ar por agroquímicos

(e.g., agrotóxicos e fertilizantes), eutrofização artificial, excessivo consumo de água para irrigação e poluição atmosférica por meio das queimadas (BORDONAL et al., 2018).

A intensificação dos cultivos de cana-de-açúcar está associada ao aumento do uso dos agrotóxicos, dentre eles o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o fipronil (GOULART et al., 2020; SCHIESARI e GRILLITSCH, 2011). Os agrotóxicos podem estar nas formas biodisponíveis e afetar as espécies para as quais eles são utilizados, além de conferir risco aos organismos não-alvo. Os agrotóxicos que são aplicados diretamente no solo ou nos cultivos podem atingir os recursos hídricos por meio da lixiviação e do escoamento superficial (ANTUNES et al., 2010; BALIAN et al., 2008; CHEN et al., 2017; DAVIS et al., 2013). Dessa forma, as pressões exercidas pelas atividades agropecuárias devem ser avaliadas, especialmente em relação à ecotoxicidade desses contaminantes e à manutenção dos serviços ecossistêmicos (POWER, 2010; ZHANG et al., 2007).

Diante do risco ecológico decorrente da presença desses contaminantes no ambiente, técnicas de remediação precisam ser aplicadas em áreas de cultivo de cana-de-açúcar (FILOSO et al., 2015; GOLDEMBERG et al., 2008; OGURA et al., 2022b). Nesse aspecto, a recuperação de solos contaminados por agrotóxicos pode ser feita por meio da fitorremediação, que consiste no uso de plantas para a estabilização, degradação ou extração dos contaminantes-alvo do solo (BOUCARD et al., 2005; EEVERS et al., 2017; GLICK, 2003; KANG, 2014). No solo, esse processo pode ser feito com o auxílio de plantas utilizadas para a adubação orgânica, que também auxiliam a ciclagem de nutrientes e recuperação da qualidade do solo (FLORIDO et al., 2014). Na água, a fitorremediação pode ser feita por meio da aplicação de macrófitas aquáticas, capazes de absorver ou degradar os agrotóxicos (CHANDER et al., 2018; DHIR et al., 2009).

Nesse contexto, a presente pesquisa visou à avaliação da fitotoxicidade e da fitorremediação dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D em água e solos contaminados relacionados

ao cultivo de cana-de-açúcar. Espécies de plantas terrestres e aquáticas foram avaliadas quanto à fitotoxicidade e utilizadas em ensaios de fitorremediação, nos quais foram verificadas a bioacumulação e a redução da ecotoxicidade para organismos bioindicadores em escala laboratorial.

Em síntese, a relevância da avaliação da fitotoxicidade e da fitorremediação de água e solos contaminados pelos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, destaca-se por:

- i) Com o aumento progressivo do uso dos agrotóxicos, é fundamental que os seus efeitos ecotoxicológicos sejam conhecidos, especialmente em condições de contaminação com múltiplos estressores (e.g., agrotóxicos em mistura);
- ii) Bioensaios com plantas apresentam baixo custo de execução e manutenção, além da facilidade metodológica, e podem contribuir para a compreensão da fitotoxicidade em culturas agrícolas expostas aos resíduos de agrotóxicos;
- iii) A escolha das plantas utilizadas na fitorremediação deve ser priorizada com espécies nativas da área de estudo, especialmente aquelas que possuem rápido crescimento e capacidade de acumulação dos contaminantes;
- iv) Estudos ecotoxicológicos com espécies bioindicadoras sensíveis e representativas de diferentes níveis tróficos podem complementar as análises químicas para a determinação da eficiência do processo de fitorremediação.

2. APRESENTAÇÃO DA TESE

A tese intitulada “Fitotoxicidade e fitorremediação de água e solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil aplicados no cultivo de cana-de-açúcar” foi resultado do período de doutorado (2018 – 2022) realizado no Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo [EESC – USP].

A presente pesquisa esteve inserida no Projeto Temático apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [FAPESP] intitulado “*Environmental effects of the pasture-sugarcane conversion and pasture intensification*”, Processo 2015/18790-3, coordenado pelo pesquisador responsável Prof. Dr. Luiz Antonio Martinelli. Nesse Projeto Temático, três formas de uso e ocupação do solo foram estudadas:

- (i) *low-input pasture*, na qual as pastagens foram cultivadas com técnicas tradicionais e corresponderam aos *plots* controle;
- (ii) *intensificação de pastagens*, na qual as áreas destinadas à criação de gado foram reduzidas e fertilizantes químicos foram aplicados, dentre eles o NPK (nitrogênio-fósforo-potássio);
- (iii) *conversão das pastagens* tradicionais em áreas de cultivo de cana-de-açúcar, com análise da aplicação localizada de vinhaça na fertirrigação e do uso dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, cenário no qual a presente pesquisa esteve inserida.

Nesse contexto, a tese desenvolvida permitiu a avaliação dos ensaios de fitotoxicidade com espécies de plantas aquáticas e terrestres para determinar os efeitos do 2,4-D e do fipronil, isolados e em mistura. Assim, caso esses efeitos fossem significativos para o desenvolvimento vegetal, riscos para o uso do solo seriam esperados, incluindo prejuízos ao cultivo de outras espécies ou captação dessa água para a irrigação. Os bioensaios com plantas apresentam algumas vantagens, como o baixo custo de execução e manutenção. Além disso, destaca-se a

facilidade metodológica, uma vez que os ensaios podem ser iniciados a qualquer momento e não dependem de muitos cuidados para a manutenção de culturas. Entretanto, as plantas podem ser menos sensíveis que outras espécies bioindicadoras, o que ressalta a importância do estudo de diferentes espécies para fins de avaliação de risco ecológico. Devido ao potencial de bioacumulação dos agrotóxicos, a fitorremediação se apresenta como uma alternativa para a recuperação de solos e águas contaminadas. Entretanto, ainda é necessário que as análises químicas dos compostos-alvo e dos subprodutos sejam complementadas com ensaios ecotoxicológicos com organismos bioindicadores após a fitorremediação para verificar a possível diminuição da ecotoxicidade.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS PROPOSTOS

A hipótese central da presente pesquisa estabeleceu que plantas terrestres e aquáticas apresentam fitotoxicidade quando expostas aos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, mas são capazes de fitorremediar esses contaminantes em solo e água. Nesse contexto, o objetivo geral da tese foi determinar os efeitos de fitotoxicidade e a bioacumulação dos agrotóxicos estudados em plantas aquáticas e terrestres. Para tanto, foram estabelecidas quatro sub-hipóteses, com os seus respectivos objetivos específicos.

Sub-hipótese 1: Plantas aquáticas e terrestres apresentam maior fitotoxicidade quando expostas ao herbicida 2,4-D em relação ao inseticida fipronil. Além disso, os efeitos de fitotoxicidade são mais acentuados quando as plantas estudadas são expostas aos agrotóxicos em mistura.

Objetivo específico 1: Avaliar a exposição das plantas aquáticas e terrestres em ensaios de fitotoxicidade em água e solos contaminados com os agrotóxicos estudados, de forma isolada e em mistura.

Sub-hipótese 2: As plantas menos sensíveis aos agrotóxicos 2,4-D e fipronil apresentam maior potencial para fitorremediação de águas e solos contaminados, de modo que a seleção da espécie mais recomendada seja feita pela comparação do desenvolvimento de biomassa.

Objetivo específico 2: Comparar a sensibilidade das plantas aquáticas e terrestres em diferentes concentrações dos agrotóxicos estudados, de modo que as plantas mais resistentes e que produzam maior biomassa possam ser utilizadas para a fitorremediação.

Sub-hipótese 3: Por meio da fitorremediação, as plantas estudadas reduzem as concentrações de 2,4-D e fipronil de águas e solos contaminados e, por consequência, diminuem a ecotoxicidade aos organismos não-alvo.

Objetivo específico 3: Verificar a ocorrência da fitorremediação dos contaminantes na água e no solo, com base na comparação dos resultados da quantificação química com as análises ecotoxicológicas com organismos bioindicadores.

Sub-hipótese 4: Durante o processo de fitorremediação, as plantas aquáticas e terrestres são capazes de bioacumular os agrotóxicos 2,4-D e fipronil na biomassa vegetal.

Objetivo específico 4: Quantificar os agrotóxicos estudados na biomassa vegetal, como forma de determinar se as plantas utilizadas são hiperacumuladoras. Além disso, determinar o potencial de translocação dos agrotóxicos das raízes para a parte aérea das plantas.

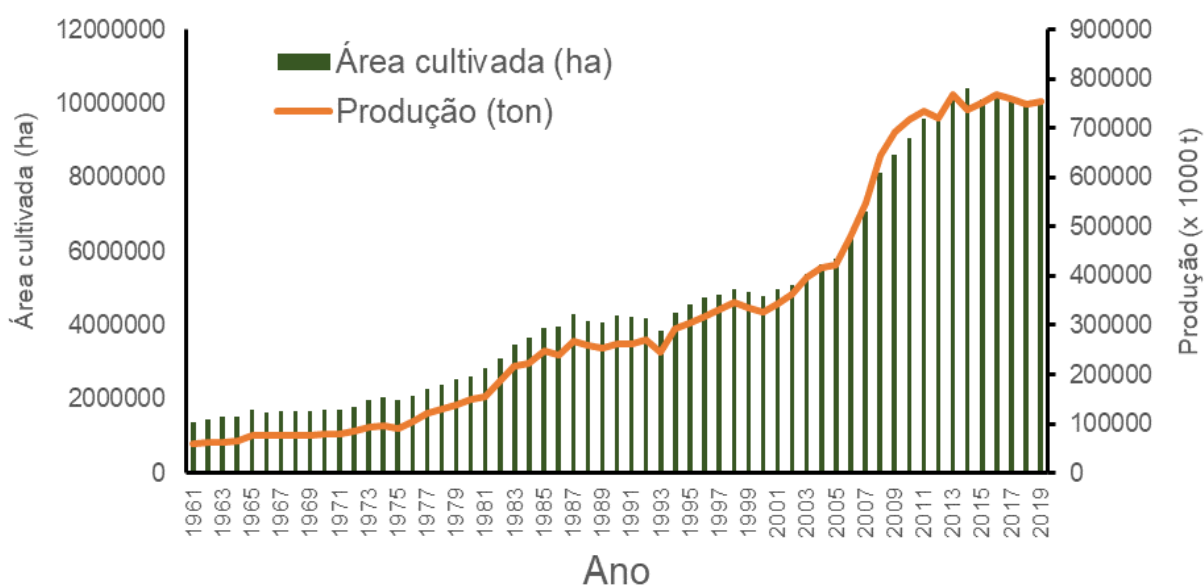
Dessa forma, com base nos resultados obtidos, espera-se que o presente trabalho possa contribuir para estudos de fitotoxicidade com espécies vegetais não-convencionais (e.g., macrófitas aquáticas e plantas utilizadas para adubação orgânica) e para a aplicação de estratégias de remediação de solos e águas contaminadas no contexto dos cultivos de cana-de-açúcar.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (Figura 1), com 8.605.000 ha de área cultivada e 665 milhões de t de produção total (CONAB, 2020). Nos últimos 20 anos, segundo dados da CONAB e da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação [FAO], essa área praticamente dobrou (4.804.000 ha em 2000) e a produtividade aumentou 14% (de 67,8 para 77,3 t ha⁻¹) (CONAB, 2020; FAO, 2020). A região Sudeste do Brasil lidera o setor sucroenergético, com 66% da produção nacional para a safra 2020/21, seguida pelas regiões Centro-Oeste (21%), Nordeste (8%), Sul (5%) e Norte (1%) (CONAB, 2020). Destaca-se que o estado de São Paulo é o maior produtor nacional de cana-de-açúcar (54% do total), seguido por Goiás (11,4%) e Minas Gerais (10,6%). Entre as safras 2019/20 e 2020/21, houve aumento na área cultivada (2,9%), produção (5,5%) e produtividade (i.e., produção por área) (2,5%) no estado de São Paulo (CONAB, 2020).

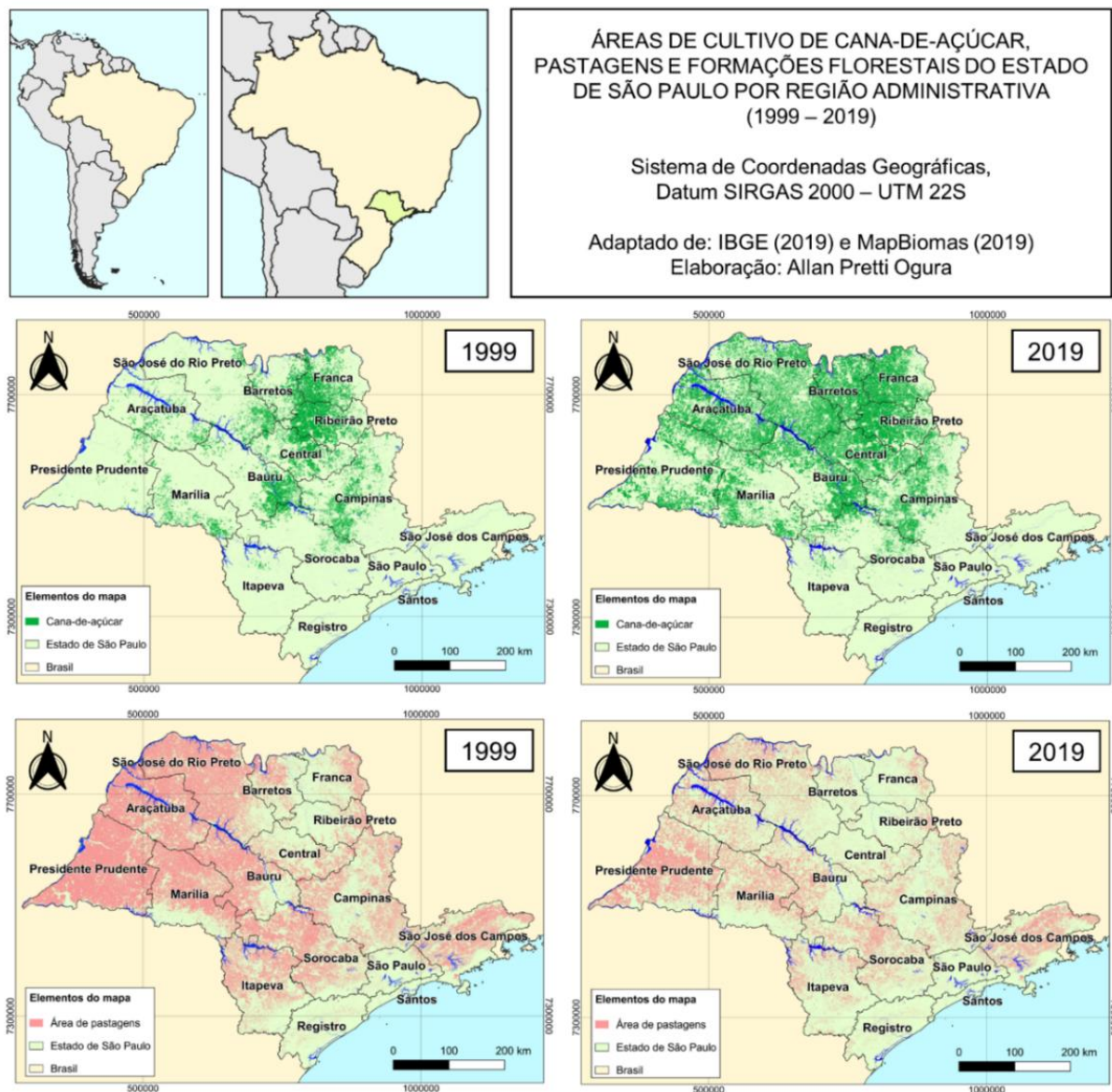
Figura 1 – Expansão do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil (entre 1961 e 2019), considerando o aumento de área cultivada (ha) e de produtividade (x1000 t). (Adaptado de OGURA et al., 2022b).



A conversão de pastagens subutilizadas em áreas produtivas de cultivo é uma alternativa para readequar a distribuição espacial das atividades agrícolas, reduzindo áreas para

pecuária, aumentando a densidade de gado e realocando as terras remanescentes para outros usos (DEFANTE et al., 2018; SCHIESARI e GRILLITSCH, 2011), principalmente para a produção de biocombustíveis (e.g., etanol). Mapas de mudanças de uso da terra (de 1999 a 2019) identificaram o processo de conversão de pastagens para cultivo de cana-de-açúcar (Figura 2), predominantemente nas regiões Oeste e Noroeste do estado (IBGE, 2019; MAPBIOMAS, 2019; OGURA et al., 2022b). Nesse trabalho, observou-se que o número de áreas de pastagem diminuiu (53,5%), enquanto o cultivo de cana-de-açúcar aumentou significativamente (143,8%). Na primeira década (i.e., de 1999 a 2009), o número de áreas de cultivo de cana-de-açúcar dobrou (observou-se um aumento de 100,2%) e na segunda (i.e., de 2009 a 2019), a área aumentou 21,8%. Por outro lado, a diminuição das áreas de pastagem foi semelhante nas duas décadas (32,8 e 30,9%, respectivamente). Portanto, conhecer os fatores que coordenam os vetores de crescimento da cultura pode auxiliar na previsão de áreas prioritárias para o manejo ambiental das práticas agrícolas (OGURA et al., 2022b). Impactos ambientais podem surgir do manejo inadequado do solo para o cultivo da cana-de-açúcar, incluindo degradação do solo, deterioração de sistemas aquáticos, poluição por nitrogênio e destruição de ecossistemas ribeirinhos; impactos na saúde pública e questões sociais envolvem doenças respiratórias decorrentes da queima de cana-de-açúcar e exploração de cortadores de cana (MARTINELLI e FILOSO, 2008).

Figura 2 – Uso e ocupação do solo no estado de São Paulo em 1999 e 2019 por região administrativa: Áreas de cultivo de cana-de-açúcar e pastagens (Adaptado de OGURA et al., 2022b).



Uma diminuição significativa na abundância e diversidade da macrofauna do solo já foi observada devido à substituição de áreas de pastagem para cultivo de cana-de-açúcar no Brasil (FRANCO et al., 2016). BENTO et al. (2018) estudaram os efeitos sobre os gases de efeito estufa [GEE] das mudanças no uso da terra causadas pela expansão da cana-de-açúcar sobre pastagens de gado de baixa intensidade brasileiras; os autores identificaram que essa conversão pode aumentar as emissões anuais estimadas de CO₂ equivalente. Porém, o transporte da cana-de-açúcar bruta também contribui para as emissões de GEE. CANISARES

et al. (2020) apontaram que a porosidade dos solos em microescala coletados nas regiões centro-sul do Brasil foi reduzida devido às mudanças de uso da terra em questão para cada tipo de solo analisado ou condições locais. No entanto, ainda faltam estudos que integrem indicadores físicos, químicos e biológicos de qualidade do solo e manejo sustentável em sistemas de cana-de-açúcar (MARTÍNI et al., 2020).

No processamento da cana-de-açúcar, que envolve a moagem e a produção de açúcar e etanol, além das emissões de GEE, o processo industrial gera subprodutos e resíduos que podem impactar o ambiente. Por exemplo, a vinhaça da cana-de-açúcar é um dos principais subprodutos gerados nas usinas de etanol, sendo que cada litro de etanol produzido gera de 10 a 15 litros de vinhaça (LUDOVICE, 1997). A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo [CETESB] estabeleceu critérios para o manejo e disposição da vinhaça no solo, quantificando a dosagem de acordo com as concentrações de potássio (CETESB, 2015). No entanto, aspectos nocivos podem surgir da aplicação da vinhaça, como a salinização e acidificação do solo, contribuição difusa de metais e nutrientes para os recursos hídricos adjacentes por escoamento e lixiviação e liberação de GEE (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; FUESS et al., 2021; RODRIGUES REIS e HU, 2017).

Mudanças comportamentais predatórias e antipredatórias em peixes neotropicais podem ser causadas pela cinza da cana-de-açúcar (YOFUKUJI et al., 2021) e efeitos subletais da vinhaça da cana-de-açúcar já foram identificados em minhocas nativas brasileiras (ALVES et al., 2015). A vinhaça de cana-de-açúcar tem sido associada a efeitos ecotoxicológicos em organismos aquáticos e terrestres (e.g., inibição do crescimento, redução nas taxas de reprodução e letalidade) (OGURA et al., 2022a; PINTO et al., 2021a; SILVA et al., 2021). Além disso, o processamento da cana-de-açúcar produz grandes quantidades de subprodutos de biomassa. Por exemplo, 1,0 t de cana-de-açúcar gera aproximadamente 280 kg de bagaço úmido e 250 kg (peso seco) de folhas (CHANDEL et al., 2012). A crescente demanda por

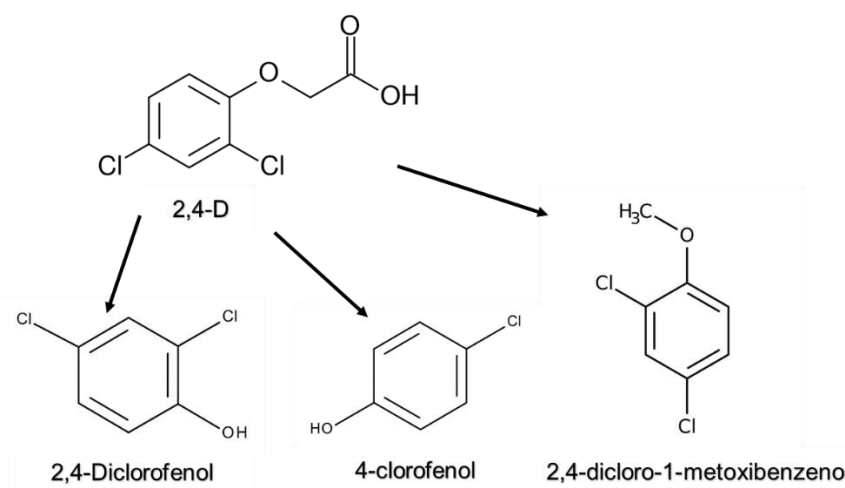
bioetanol prevista até 2030 pode aumentar o risco de escassez de água no Brasil e levar a intensas secas agrícolas (DUDEN et al., 2021). Em média, são necessários 22 m³ de água por tonelada de cana em uma usina que produz 50% de etanol e 50% de açúcar; nesse contexto, ocorre um consumo ainda maior de água durante as lavagens no processo de segunda geração (UNICA, 2013). Portanto, alternativas com foco no reaproveitamento são essenciais na perspectiva da economia circular.

Além do exposto, os agrotóxicos representam riscos de contaminação em áreas de cultivo de cana-de-açúcar. Acayaba et al. (2020) observaram que os herbicidas apresentaram a maior frequência de detecção (75%) entre os tipos de agrotóxicos, seguidos por fungicidas (53%) e inseticidas (42%) em águas superficiais e subterrâneas localizadas em áreas de cultivo de cana-de-açúcar do estado. No entanto, eles concluíram que os agrotóxicos não estavam correlacionados nem com a estação climatológica (i.e., seca e chuvosa) nem com os usos da terra (i.e., urbano e não urbano). Além disso, agrotóxicos perigosos levantam problemas de saúde humana pelo risco aos consumidores de água, consumo de produtos agrícolas contaminados, contato com água, alimentos e ar contaminados, especialmente para trabalhadores rurais expostos (GREGORY ROBSON et al., 2022). A contaminação por agrotóxicos pode comprometer a sobrevivência de várias espécies não-alvo de diferentes nichos. Como exemplo, os agrotóxicos 2,4-D e fipronil, amplamente utilizados no cultivo da cana-de-açúcar, têm sido associados à ecotoxicidade em organismos terrestres (e.g., plantas, colêmbolos e enquitreídeos) e aquáticos (e.g., microalgas, cladóceros, crustáceos, quironomídeos e peixes) (MOREIRA et al., 2020; OGURA et al., 2022a; PINTO et al., 2021b, 2021c; SILVA et al., 2020; TRIQUES et al., 2021; VIANA et al., 2021).

4.2. Agrotóxicos 2,4-D e fipronil

O herbicida 2,4-D (Figura 3) é um ácido clorofenoxiacético utilizado no controle de plantas de folhas largas, especialmente dicotiledôneas (SONG, 2014). Esse composto é utilizado como ingrediente ativo de formulações comerciais de herbicidas, comumente na forma líquida ou em pó, e pertence à classe dos herbicidas fenoxiacéticos, com caráter seletivo pós-emergente (KIM et al., 2021). Dentre as culturas que recebem aplicação de 2,4-D, destacam-se arroz, aveia, café, cana, centeio, cevada, milho, pastagens, soja, sorgo e trigo (MAPA, 2022; PETERSON et al., 2016). Nas plantas-alvo, o 2,4-D atua como uma auxina sintética, um hormônio associado ao crescimento vegetal, e possui capacidade desfolhante (KIM et al., 2021; SONG, 2014). Além disso, esse herbicida pode causar crescimento anormal, desregular a divisão celular e alterar o transporte de nutrientes, o que pode levar à morte de plantas. O 2,4-D também pode causar câncer, doenças neurológicas e riscos na reprodução em humanos e mamíferos (GARABRANT e PHILBERT, 2002).

Figura 3 – Fórmula estrutural do 2,4-D e dos seus principais produtos de degradação, incluindo o 2,4-Diclorofenol, 4-clorofenol e 2,4-dicloro-1-metoxibenzeno (Adaptado de KIM et al. (2021)).

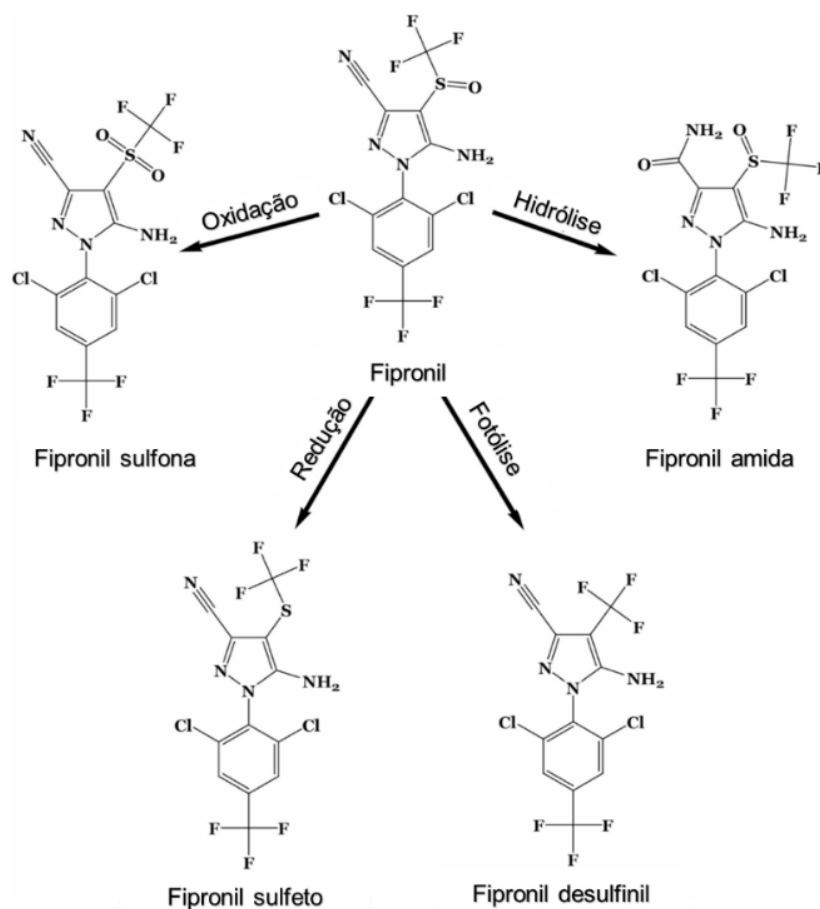


Nos solos, o 2,4-D apresenta tempo de meia vida de 7 a 14 dias, podendo se mineralizar e se tornar indisponível (BOIVIN et al., 2005; MERINI et al., 2007). A degradação é feita por

microrganismos, essencialmente em polissacarídeos, lipídeos e proteínas, mas pode ocorrer formação do metabólito 2,4-diclorofenol (BOTERO et al., 2017; MERINI et al., 2007). Devido à alta solubilidade e à leve persistência, esse herbicida pode ser encontrado em águas superficiais, sendo que estudos internacionais reportaram concentrações entre 4 e 24 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BURNS e SWAEN, 2012; ISLAM et al., 2018; SONG, 2014). No Brasil, particularmente no estado de São Paulo, a CETESB detectou o 2,4-D em 14% das amostras (entre 143,1 a 366,6 $\mu\text{g L}^{-1}$) (CETESB, 2017). No sul do Brasil, o 2,4-D foi detectado em rios localizados em áreas de cultivo de arroz (3,0 e 3,4 $\mu\text{g L}^{-1}$) (MARCHESAN et al., 2010).

O fipronil é um inseticida sistêmico utilizado normalmente na forma granular e apresenta os metabólitos sulfona, sulfeto, amida e desulfinil (Figura 4) como os principais subprodutos de degradação (CHATTERJEE e GUPTA, 2010; MANDAL e SINGH, 2013; SIMON-DELISO et al., 2015; RAMASUBRAMANIAN e PARAMASIVAM, 2017). O fipronil pertence ao grupo dos fenilpirazóis e tem um amplo espectro de ação, em especial pelo bloqueio de canais de cloro mediados pelo neurotransmissor de inibição ácido gama-aminobutírico [GABA] (KIM et al., 2021). No solo, a maior parte (~80%) do fipronil permanece nas camadas superficiais e a forma granular apresenta menor mobilidade no solo em relação à solução aquosa (CHATTERJEE e GUPTA, 2010). No solo, o tempo de meia-vida do fipronil varia entre 43 e 50 dias e ocorre degradação principalmente por processos oxidativos, caracterizando a presença predominante da sulfona como subproduto (MANDAL e SINGH, 2013). Dentre as 176 amostras de água superficial avaliadas pela CETESB, o fipronil foi detectado em 75% (entre 2,4 e 465 $\mu\text{g L}^{-1}$) (CETESB, 2017). Em sistemas lóticos de áreas de cultivo de arroz no sul do Brasil, ocorreu detecção de fipronil entre 0,05 e 26,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MARCHESAN et al., 2010).

Figura 4 – Fórmula estrutural do fipronil e principais rotas de degradação para os metabólitos sulfona (oxidação), sulfeto (redução), amida (hidrólise) e desulfenil (fotólise) (Adaptado de SINGH et al. (2021)).



As condições climáticas (e.g., temperatura e precipitação) e as características do solo (e.g., umidade, matéria orgânica e pH) influenciam o destino ambiental dos agrotóxicos (DAAM et al., 2019), particularmente em áreas de cultivo intensivo de cana-de-açúcar em ambientes tropicais. Em relação aos agrotóxicos, o solo é a principal via de contaminação das águas subterrâneas (e.g., por lixiviação) e águas superficiais (e.g., por escoamento, aplicação direta, pulverização, dispersão aérea e erosão) (VRYZAS, 2018). A suscetibilidade das águas subterrâneas à contaminação por agrotóxicos depende do tipo de solo, clima, uso da terra, profundidade dos poços, condições hidrogeológicas e natureza dos agrotóxicos (ACAYABA et al., 2020). Contaminações ocasionais de aquíferos podem comprometer os usos das águas subterrâneas, incluindo irrigação e abastecimento humano. Ao comparar as propriedades físicas e químicas dos dois agrotóxicos estudados (Tabela 1), observa-se que o 2,4-D apresenta

maior solubilidade (540 mg L^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$) em relação ao fipronil ($1,9$ a $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Por outro lado, o coeficiente de adsorção (K_{oc}) indica que o 2,4-D ($K_{oc} = 20$ a 136) apresenta menor afinidade à matéria orgânica do solo em relação ao fipronil ($K_{oc} = 825$ a 6863).

Tabela 1 – Propriedades físicas e químicas dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil (Adaptado de KIM et al. (2021)).

Propriedade	2,4-D	Fipronil
Classificação	Herbicida	Inseticida
Nomenclatura oficial (IUPAC)	2-(2,4-dichlorophenoxy)acetic acid	5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-(trifluoromethylsulfinyl)pyrazole-3-carbonitrile
Fórmula molecular	$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$	$\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_2\text{F}_6\text{N}_4\text{OS}$
Peso molecular	$221,03 \text{ g mol}^{-1}$	$437,10 \text{ g mol}^{-1}$
Identificador CAS	94-75-7	120068-37-3
Ponto de ebulição	$160 \text{ }^\circ\text{C}$ a 4 mm Hg	$200 \text{ }^\circ\text{C}$
Ponto de fusão	$138 \text{ }^\circ\text{C}$	-
Solubilidade em água	540 mg L^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 677 mg L^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	$1,9 \text{ mg L}^{-1}$ (em pH 5) a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ (em pH 9) a $20 \text{ }^\circ\text{C}$
Densidade	$1,42$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$	$1,477 - 1,626$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$
Pressão de vapor	$1,40 \times 10^{-7} \text{ mm Hg}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($1,86 \times 10^{-2} \text{ mPa}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$)	$2,78 \times 10^{-9} \text{ mm Hg}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$
Coefficiente de partição n-octanol-água (log Kow)	2,81	4,00
Constante da Lei de Henry	$9,75 \times 10^{-8} \text{ atm-cu m/mole}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$	$8,42 \times 10^{-10} \text{ atm-cu m/mol}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$
Constante de dissociação (pKa)	2,73	-
Koc	20 – 136	825 – 6863

4.3. Ecotoxicidade dos agrotóxicos

Estudos ecotoxicológicos já têm demonstrado os efeitos do fipronil e do 2,4-D. Por exemplo, Weston e Lydy (2014) indicaram que a espécie *Chironomus dilutus* foi mais sensível ao fipronil dentre os 14 macroinvertebrados bentônicos avaliados, com concentração que causa 50% de efeito [CE_{50}] de $32,5 \text{ ng L}^{-1}$. Em geral, os autores identificaram que o subproduto fipronil sulfona foi mais tóxico que o fipronil sulfeto, sendo que os dois foram mais tóxicos que o composto parental. Para o cladóceros *Ceriodaphnia dubia*, efeitos crônicos na inibição da

reprodução foram observados e foi obtida CE_{50} de $10,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para enantiômeros do fipronil (KONWICK et al., 2005; WILSON et al., 2008). Wu et al. (2014) identificaram efeitos subletais do fipronil em enzimas do peixe *Danio rerio*, além de obter CL_{50} de $220,4 \mu\text{g L}^{-1}$. Stefani Margarido et al. (2013) analisaram interferências do fipronil em biomarcadores bioquímicos, em especial a inibição da glutathione S-transferase em girinos da espécie *Scinax fuscovarius* em concentrações de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ da formulação comercial Regent®800WG.

Em solo artificial, o fipronil apresentou-se pouco tóxico para minhocas do gênero *Pheretima* spp., com CE_{50} maior que 8550 mg kg^{-1} (MOSTERT et al., 2002). Não foram observados efeitos agudos para a minhoca *Eisenia andrei*, apesar de ocorrer interferência na reprodução na CE_{20} de $23,16 \text{ mg kg}^{-1}$ (ALVES et al., 2013). Para *Folsomia candida*, foi observada bioacumulação do composto em 96 h e obtida CE_{50} de 450, 430 e $160 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente para fipronil, sulfona e sulfeto caracterizando maior toxicidade dos subprodutos (SAN MIGUEL et al., 2008). Em estudos com *Allium cepa* (cebola), o fipronil, em concentrações acima de 2,5 ppm, causou efeitos de genotoxicidade, com alteração do micronúcleo e aberrações cromossômicas (KARAISSMAILIOGLU, 2017).

Quanto à ecotoxicidade do 2,4-D, efeitos letais e subletais ocorreram em espécies aquáticas e terrestres. Para o peixe *Cnesterodon decemmaculatus*, foi constatado valor de CE_{50} de 1008 mg L^{-1} (RUIZ DE ARCAUTE et al., 2016), estresse oxidativo e perturbações metabólicas para a bactéria *Escherichia coli* em doses subletais (BHAT et al., 2015), concentração de inibição de crescimento de $1353,8$ e $71,2 \text{ mg L}^{-1}$ para a alga *Ankistrodesmus falcatus* e a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, respectivamente (MARTÍNEZ-RUIZ e MARTÍNEZ-JERÓNIMO, 2018), além de uma CE_{50} de 2 mg L^{-1} para a alga *Scenedesmus acutus* (ZHU et al., 2016). Fitotoxicidade foi observada em raízes de *Allium cepa*, em especial ação mitodepressiva em concentração de $4,02 \text{ mg L}^{-1}$ no período de 48h (ÖZKUL et al., 2016). Estresse oxidativo foi identificado na minhoca *E. andrei* em concentrações subletais de 3,5, 7

e 14 mg kg^{-1} , além da redução do tamanho dos organismos e da menor estabilidade da membrana lisossômica (HATTAB et al., 2015).

O estudo dos agrotóxicos em mistura é relevante, uma vez que o efeito nocivo de substâncias tóxicas em mistura pode ser potencializado em caso de ocorrência de sinergismo, ou pode ser atenuado em casos de antagonismo (JONKER et al., 2005). Por exemplo, houve sinergismo dos agrotóxicos abamectina e difenoconazol, que causaram mais efeitos tóxicos a cladóceros neotropical *Macrothrix flabelligera* e ao peixe *Danio rerio* quando em mistura, especialmente em altas doses (MOREIRA et al., 2017; SANCHES et al., 2017). O 2,4-D, em associação ao glifosato, apresentou efeito sinérgico para a comunidade fitoplanctônica e o perifíton (LOZANO et al., 2018).

Para avaliação dos efeitos dos contaminantes sobre o meio ambiente e os organismos presentes, além dos estudos de ecotoxicidade em laboratório, os micro e mesocosmos podem ser utilizados como unidades experimentais para simular modelos ecossistêmicos e que permitem avaliar, em escala reduzida, os impactos de contaminantes no ambiente e a sua interferência nas relações entre as espécies (ODUM, 1984). Nesse caso, é necessário que as características representadas nos microcosmos sejam similares às daquelas do estudado, principalmente referentes à qualidade da água e do sedimento e às espécies presentes, de modo a monitorar as mudanças promovidas pelas interferências ocasionadas pela adição dos contaminantes no meio (JAMES e BOONE, 2005; SZÖCS et al., 2015).

4.4. Fitorremediação

Diante do contexto de contaminação de águas e solo, uma das alternativas para recuperação dessas áreas é a remediação, que consiste na remoção de substâncias consideradas nocivas ao meio ambiente e que podem ocasionar poluição ambiental caso promovam distúrbios nos ecossistemas. Nesses casos, recomenda-se que se elimine ou se interrompa a

fonte de poluição para evitar que o problema de contaminação se agrave. Entretanto, para fontes difusas de contaminantes, esse processo passa a ser mais complexo. Nesse âmbito, as medidas são aplicadas como forma de remoção, contenção ou redução dos contaminantes. A escolha da técnica mais adequada depende da caracterização ambiental da área, da disponibilidade de recursos financeiros e do prazo de execução dessas medidas (FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ et al., 2014; HOU e AL-TABBAA, 2014).

Singh e Singh (2016) revisaram a degradação microbiológica de solos contaminados com herbicidas, dentre eles o 2,4-D, e identificaram que existe potencial da aplicação dessa prática em associação com a fitorremediação. Hua et al. (2017) avaliaram a remediação de agrotóxicos organoclorados no sedimento de lagos e obtiveram bons resultados para a aplicação de carvão ativado, principalmente devido à maior superfície de contato. Aksu e Kabasakal (2005) aplicaram o carvão ativado para a remoção de 2,4-D por adsorção em solução aquosa e concluíram que o processo ocorre com maior eficiência em pH 2, para a dosagem de 333,3 mg de carvão ativado em pó por g de herbicida. Cotillas et al. (2018) utilizaram processos combinados com adsorção eletroquímica para remoção do 2,4-D em solos contaminados, sendo que os autores obtiveram sucesso na remoção de 20 g herbicida em 100 g de solo, sob corrente elétrica de 0,5 A por 2 h. Agostini de Moraes et al. (2013) aplicaram biopolímeros para a remediação de herbicidas em águas contaminadas e indicaram potencial na adsorção dos compostos orgânicos. Entretanto, essas técnicas exigem maior investimento e, uma vez que consistem em ações pontuais de remediação, podem ser de difícil aplicação em larga escala (WEYENS et al., 2009).

Nesse contexto, dentre as técnicas de recuperação de áreas degradadas, destaca-se a biorremediação, que objetiva recuperar uma área degradada por meio da ação de microrganismos e plantas que são capazes de sobreviver no meio contaminado e, ao mesmo tempo, remover, degradar ou extrair contaminantes do solo ou da água. Dentre os vários

tratamentos que compõem a biorremediação *in situ*, a bioestimulação, que consiste na adição de nutrientes e oxigênio necessários para estimular os microrganismos endógenos, acelera a degradação dos compostos orgânicos presentes (FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ et al., 2014). Para a escolha dos microrganismos, é necessário levar em consideração sua capacidade em degradar o contaminante alvo e o tempo necessário para que isso ocorra. Cychón et al. (2017) indicaram que os fatores que interferem na bioacumulação de agrotóxicos nos organismos remediadores são o pH, temperatura, tipo de solo, concentração do agrotóxico, quantidade de água e matéria orgânica, a presença de carbono e nitrogênio, além das interações dos organismos remediadores com as outras espécies do meio. Dessa forma, a biorremediação apresenta-se como uma alternativa com menor custo associado e vantagens ecossistêmicas associadas, que permitem a reestruturação ambiental e podem promover maior sustentabilidade para as técnicas de remediação (HOU e AL-TABBAA, 2014).

A fitorremediação é um tipo de biorremediação que pode ser aplicada para metais e compostos orgânicos (e.g., agrotóxicos) e consiste no uso de plantas capazes de descontaminar o solo ou a água (EVANGELOU et al., 2015; OLETTE et al., 2008). Essas técnicas podem ser divididas entre fitoestabilização, quando ocorre a contenção do contaminante na estrutura do vegetal, e a fitoextração, quando as plantas são removidas da área degradada e, usualmente, destinadas a um aterro sanitário ou incineradas (EVANGELOU et al., 2015). Em geral, essas práticas apresentam baixo custo, mas é necessário escolher adequadamente as espécies vegetais utilizadas. Para que não haja distúrbio ambiental com a inserção de uma espécie exótica, plantas nativas são recomendadas (FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ et al., 2014). As espécies escolhidas devem apresentar alta capacidade de absorção, sistema radicular profundo e bom desenvolvimento na área de estudo (ROMEIRO et al., 2007).

4.4.1. Fitorremediação de agrotóxicos com plantas terrestres

Espécies de plantas nativas podem ser utilizadas para adubação orgânica, uma vez que contribuem com a ciclagem de nutrientes e melhoram a qualidade do solo. Essas plantas também podem ser utilizadas na fitorremediação de solos contaminados. Por exemplo, *Canavalia ensiformis* (feijão de porco) e *Mucuna pruriens* (mucuna cinza) apresentam potencial para a fitorremediação de herbicidas, conforme observado por Pires et al. (2003) para o tebuthiuron. Ibrahim et al. (2013) estudaram a remoção do herbicida atrazina em solos por meio da espécie *Zea mays* (milho). Por outro lado, outras espécies também já foram estudadas. Ramborger et al. (2017) identificaram potencial de fitorremediação e degradação de 2,4-D por *Plectranthus neochilus* (boldo) apenas quando as plantas foram expostas diretamente na solução, sendo que a degradação natural do herbicida no solo não apresentou diferenças em relação ao tratamento com a fitorremediação.

Florido et al. (2014) avaliaram remoção do herbicida imazaquim utilizando plantas de adubação orgânica, *Dolichos lablab*, *Cajanus cajan*, *Canavalis ensiformis*, *Crotalaria juncea*, *C. breviflora*, *C. spectabilis*, *Mucuna deeringiana*, *M. cinerea*, *M. aterrima*, *Lupinus albus*, *Helianthus annuus*, *Pennisetum glaucum*, *Avena strigosa* e *Raphanus sativus*. Os autores obtiveram resultados melhores para *M. cinerea* para o fator de translocação do contaminante para parte aérea e a *C. ensiformes* para rizoacumulação. *Panicum maximum* foi utilizada para fitorremediação de solos contaminados com picloram e as maiores taxas de remoção ocorreram a partir de 60 dias de experimento (CARMO et al., 2008). *L. albus* foi a espécie que apresentou melhor fitorremediação de tebuthiuron em solos contaminados com até 0,5 kg ha⁻¹, enquanto *C. ensiformes* foi mais eficiente para contaminação de 1,0 kg ha⁻¹ (PIRES et al., 2005). *C. cajan* e *Leucaena leucocephala* apresentaram tolerância ao herbicida sulfentrazone em doses de até 400 g ha⁻¹ (MADALAO et al., 2012). Uma síntese dos estudos referentes à fitorremediação de

agrotóxicos em solos contaminados com agrotóxicos por meio da aplicação de plantas de adubação orgânica está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Estudos envolvendo fitorremediação de solos contaminados com agrotóxicos.

Espécies de plantas utilizadas	Agrotóxicos avaliados	Referências
<i>Avena strigosa</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
	Tebuthiuron	(PIRES, et al., 2005)
<i>Cajanus cajan</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
	Tebuthiuron	(PIRES et al., 2005)
	Sulfentrazone	(MADALAO et al., 2012)
	Trifloxysulfuron sodium	(SANTOS et al., 2004)
<i>Canavalia ensiformis</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
	Tebuthiuron	(PIRES et al., 2003; 2005; 2008)
	Sulfentrazone	(MADALAO et al., 2012)
	Trifloxysulfuron sodium	(SANTOS et al., 2004)
<i>Crotalaria breviflora</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
<i>Crotalaria juncea</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
	Tebuthiuron	(PIRES et al., 2008)
	Trifloxysulfuron sodium	(SANTOS et al., 2004)
<i>Crotalaria spectabilis</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
	Trifloxysulfuron sodium	(SANTOS et al., 2004)
<i>Dolichos lablab</i>	Tebuthiuron	(PIRES et al., 2005)
	Trifloxysulfuron sodium	(SANTOS et al., 2004)
<i>Helianthus annuus</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
	Trifloxysulfuron sodium	(SANTOS et al., 2004)
<i>Leucaena leucocephala</i>	Sulfentrazone	(MADALAO et al., 2012)
<i>Lupinus albus</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
	Tebuthiuron	(PIRES et al., 2005)
	Trifloxysulfuron sodium	(SANTOS et al., 2004)
<i>Mucuna aterrima</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
	Trifloxysulfuron sodium	(SANTOS et al., 2004)
<i>Mucuna cinerea</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
<i>Mucuna pruriens</i>	Tebuthiuron	(PIRES et al., 2003)
<i>Panicum maximum</i>	Picloram	(CARMO et al., 2008)
<i>Pennisetum glaucum</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
	Tebuthiuron	(PIRES et al., 2005)
	Trifloxysulfuron sodium	(SANTOS et al., 2004)
<i>Plectranthus neochilus</i>	2,4-D	(RAMBORGER et al., 2017)
<i>Raphanus sativus L.</i>	Imazaquim	(FLORIDO et al., 2014)
	Sulfentrazone	(MADALAO et al., 2012)
	Trifloxysulfuron sodium	(SANTOS et al., 2004)

4.4.2. Fitorremediação de agrotóxicos com plantas aquáticas

As macrófitas aquáticas também apresentam potencial de fitorremediação de metais e poluentes orgânicos e a eficiência varia de acordo com a espécie utilizada, o contaminante e as condições da água (DHIR; SHARMILA; SA RADHI, 2009; DOSNON-OLETTE; COUDERCHET; EULLAFFROY, 2009; GUITTONNY-PHILIPPE *et al.*, 2015). Em geral, as espécies escolhidas devem apresentar rápido crescimento, elevada produção de biomassa, sistemas radiculares que permitam a rizofiltração, ser de fácil manejo e possuir tolerância e acúmulo dos contaminantes (LU *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2005). Qu *et al.* (2017) avaliaram as espécies de macrófitas submersas *Potamogeton crispus* e *Myriophyllum spicatum* e obtiveram remoção acima de 90% de atrazina do sedimento, reduzindo o tempo de meia vida de 14,3 dias para 8,6 e 9,7 dias, respectivamente. Riaz *et al.* (2017) utilizaram as espécies *Eichornia crassipes* e *Pistia stratiotes* para remoção de organoclorados, com 62 e 60% de eficiência, respectivamente, e piretroides, com 76 e 68% respectivamente, indicando que o processo predominante é a rizoacumulação. Lv *et al.* (2016) estudaram as espécies *Typha latifolia*, *Phragmites australis*, *Iris pseudacorus* e *Juncus effusus* para remoção de imazalil (entre 46 e 96% de eficiência) e tebuconazol (entre 25 e 41%).

A espécie *E. crassipes* foi utilizada para a remoção do inseticida organofosforado ethion e os processos predominantes da fitorremediação foram os de fitodegradação do composto, correspondente a 69% de degradação (XIA e MA, 2006). A macrófita *L. minor* apresentou potencial na remoção de águas contaminadas com isoproturon (25%) e glifosato (8%) em 4 dias de experimento (DOSNON-OLETTE *et al.*, 2011). *L. minor* e *P. stratiotes* foram capazes de remover o inseticida clorpirifós de águas contaminadas, com eficiência de 82 e 87%, respectivamente, sendo que o fator de bioconcentração da *L. minor* foi maior (PRASERTSUP e ARIYAKANON, 2011). *L. minor* e *Spirodela polyrhiza* foram as macrófitas mais eficientes na remoção dos fungicidas pirimetanil (17%) e dimetomorfo (12%) (DOSNON-OLETTE *et*

al., 2009). *L. minor* também foi a melhor macrófita testada para remoção do herbicida flazasulfuron e dimetomorfo, com remoção de 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de biomassa (OLETTE et al., 2008). Uma síntese dos estudos referentes à fitorremediação de agrotóxico na água por meio de macrófitas aquáticas está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Estudos envolvendo fitorremediação de águas contaminadas com agrotóxicos.

Espécies de plantas utilizadas	Agrotóxicos avaliados	Referências
<i>Eichhornia crassipes</i>	Ethion	(XIA e MA, 2006)
	Organoclorados e piretróides	(RIAZ et al., 2017)
<i>Lemna minor</i>	Isoproturon e glifosato	(DOSNON-OLETTE et al., 2011)
	Clorpirifós	(PRASERTSUP e ARIYAKANON, 2011)
	Pirimetanil e dimetomorfo	(DOSNON-OLETTE et al., 2009)
	Flazasulfuron e dimetomorfo	(OLETTE et al., 2008)
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Atrazina	(QU et al., 2017)
<i>Pistia stratiotes</i>	Organoclorados e piretróides	(RIAZ et al., 2017)
	Clorpirifós	(PRASERTSUP e ARIYAKANON, 2011)
<i>Potamogeton crispus</i>	Atrazina	(QU et al., 2017)
<i>Spirodela polyrhiza</i>	Pirimetanil e dimetomorfo	(DOSNON-OLETTE et al., 2009)

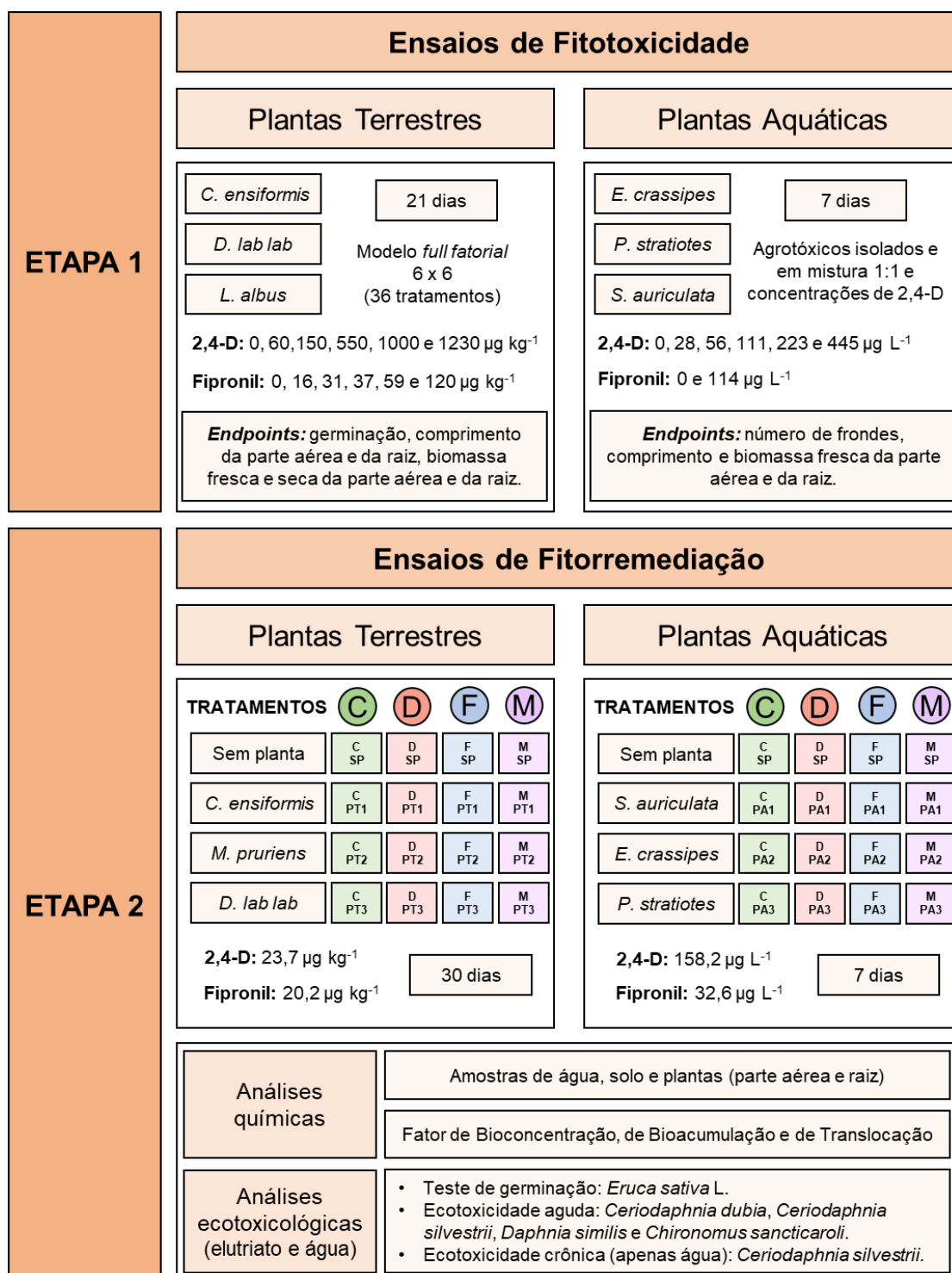
5. MÉTODOS E ETAPAS DA PESQUISA

Os experimentos laboratoriais da presente tese foram desenvolvidos majoritariamente no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada [NEEA – USP], do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais [CRHEA – USP], localizado no município de Itirapina, São Paulo. O solo utilizado foi coletado nas dependências do CRHEA – USP, enquanto a água de estudo foi preparada conforme meios padronizados de cultivo e experimentação (procedimentos descritos na Seção 5.1). Para a quantificação dos agrotóxicos nas matrizes estudadas (i.e., água, solo e biomassa vegetal), as amostras foram destinadas ao Laboratório de Química Ambiental, da Universidade Estadual de Campinas [LQA – Unicamp], sob a supervisão da Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner. A metodologia foi descrita para cada matriz estudada (Seção 5.2).

O enfoque experimental foi dividido em duas etapas (Figura 5). Na primeira, a fitotoxicidade dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil foi avaliada com os produtos isolados e em mistura para plantas terrestres e aquáticas (procedimentos descritos nas Seções 5.3 e 5.4, respectivamente). Dessa forma, o intuito foi avaliar os efeitos desses contaminantes e comparar a sensibilidade das espécies vegetais, especialmente em relação ao 2,4-D, que apresenta modo de ação herbicida. Esses resultados foram discutidos com base em outros estudos de fitotoxicidade para plantas na presença de 2,4-D e fipronil, além de outros agrotóxicos. Na segunda etapa, o potencial de fitorremediação de plantas aquáticas e terrestres foi avaliado para águas e solos contaminados com os agrotóxicos estudados (Seções 5.5 e 5.6, respectivamente). Os experimentos foram desenvolvidos para três espécies de plantas aquáticas e terrestres selecionadas (conforme os resultados das Seções 5.3 e 5.4). As matrizes vegetais foram avaliadas para a quantificação dos agrotóxicos acumulados nos tecidos da parte aérea e das raízes. Além disso, organismos bioindicadores sensíveis aos contaminantes foram utilizados

para verificar a redução da ecotoxicidade por meio da fitorremediação, como forma de complementar as análises químicas.

Figura 5 – Desenho experimental e visão geral da presente pesquisa, considerando os tratamentos controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F) e mistura 1:1 dos agrotóxicos (M) com as espécies de plantas terrestres (PT) *Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab*, *Lupinus albus* e *Mucuna pruriens* e as espécies de plantas aquáticas (PA) *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia auriculata*.



5.1. Caracterização das matrizes estudadas

5.1.1. Coleta e caracterização do solo

O solo utilizado foi coletado nas dependências do CRHEA – USP, em local sem histórico de contaminação, conforme estudos anteriores (FIGUEIRÊDO et al., 2020; MENEZES-OLIVEIRA et al., 2018). O solo foi peneirado manualmente com uma peneira metálica (abertura de 4 mm) para a padronização da granulometria e remoção de pedregulhos e cascalhos. Após a coleta, o solo passou por secagem em estufa a 60°C por 24 h, com o intuito de remoção da umidade e desfaunagem. Em seguida, o solo foi armazenado à temperatura ambiente, em caixas plásticas de polietileno estéreis. A caracterização do solo foi feita no Laboratório de Geotecnia Ambiental da EESC – USP, sob supervisão da Profa. Dra. Valéria Guimarães Silvestre Rodrigues, incluindo parâmetros físicos e químicos, como a granulometria (ABNT, 1980), pH (em H₂O e KCl), potencial de oxirredução [Eh], condutividade elétrica, densidade, índice de vazios, umidade média, porosidade, massa específica aparente, massa específica real, grau de saturação, capacidade de troca catiônica [CTC] e matéria orgânica.

5.1.2. Preparo e caracterização da água de estudo

A solução nutritiva proposta por Hoagland e Arnold (1950) foi utilizada para composição do meio de cultivo de macrófitas em laboratório (Tabela 4). Cada solução estoque foi preparada em balão volumétrico e transferida para um frasco de vidro âmbar de 1 L, que foi armazenado em geladeira. Antes do uso, os frascos foram removidos da geladeira e aclimatados à temperatura ambiente. Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado e a solução referente à dosagem necessária foi adicionada em balão volumétrico de 1 L. Para a etapa de aclimação das macrófitas, o meio de Hoagland e Arnold (1950) foi diluído 10 vezes (i.e., com 10% de solução para cada litro de água destilada).

Tabela 4 – Preparo da solução nutritiva de Hoagland e Arnold (1950).

		Preparo da solução estoque (1 L)	Dosagem (mL L ⁻¹)
	KH ₂ PO ₄ (mol L ⁻¹)	136,07 g	1,0
	KNO ₃ (mol L ⁻¹)	101,11 g	5,0
	Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O (mol L ⁻¹)	236,16 g	5,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O (mol L ⁻¹)	246,37 g	2,0
Solução de micronutrientes	H ₃ BO ₃	2,86 g	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g	
	ZnCl ₂	0,10 g	1,0
	CuCl ₂	0,04 g	
	H ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,02 g	
Solução de Fe EDTA	EDTA-Na	33,2 g	
	FeCl ₂ .6H ₂ O	24,25 g	1,0
	NaOH 1N	89 mL	

Para a segunda etapa, nos ensaios de fitorremediação, o meio de cultura selecionado foi o Taub T82MV (USEPA, 1996a). Esse meio é utilizado para experimentos de microcosmos em laboratório e permite o desenvolvimento de diferentes espécies. Portanto, a escolha desse meio foi com o intuito de que houvesse boa adaptação dos organismos bioindicadores selecionados. Para os experimentos com as matrizes aquáticas, os parâmetros físicos e químicos foram avaliados ao início e final dos experimentos, incluindo o potencial hidrogeniônico (pH – potenciômetro Micronal B374), condutividade (condutivímetro Orion 145A) e oxigênio dissolvido (OD – oxímetro YSI). As concentrações de carbono total, carbono inorgânico e carbono orgânico total nas amostras de água do poço e água de cultivo dos cladóceros foram determinadas pelo Laboratório de Biotoxicologia em Águas Continentais e Efluentes [BIOTACE] da EESC – USP, sob supervisão do Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha.

5.2. Agrotóxicos

A formulação comercial REGENT®800 WG (BASF S.A.) é aplicada no cultivo de cana-de-açúcar visando ao combate da espécie *Migdolus fryanus* (broca-da-cana), correspondente a 520 g de ingrediente ativo (i.a.) por hectare. Assim, o cenário de aplicação de

fipronil apresenta contaminação esperada de 1,04 mg i.a. por kg de solo seco. O produto comercial DMA®806 BR (Dow AgroSciences Industrial Ltda) é aplicado no cultivo de cana-de-açúcar correspondente ao recomendado para a aplicação na pré-emergência das plantas infestantes *Amaranthus viridis* (caruru-de-mancha), *Bidens pilosa* (picão-preto), *Emilia sonchifolia* (falsa-serralha), *Galinsoga parviflora* (picão-branco) e *Portulaca oleracea* (beldroega). Dessa forma, a dosagem estimada de 2,4-D referente a essa aplicação é de 3,5 L ha⁻¹, equivalente a 7 µL kg⁻¹ solo, e com concentração de 4,7 mg i.a. por kg de solo seco. Na água, assumindo 100% de aplicação direta, as Concentrações Ambientais Previstas [PEC, do inglês *Predicted Environmental Concentrations*] imediatamente após a contaminação foram de 447 µg L⁻¹ de 2,4-D e 63,49 µg L⁻¹ de fipronil, conforme trabalhos anteriores em modelos ecossistêmicos (i.e., mesocosmos de 1500 L, com área superficial de 2,46 m²) (FREITAS et al., 2022b; OGURA et al., 2022a; PINTO et al., 2021a; SILVA et al., 2021).

5.2.1. Análises de agrotóxicos em amostras de solo e água

Os procedimentos descritos seguiram o protocolo apresentado por Goulart et al. (2020). As amostras de água foram filtradas diretamente em vial de vidro âmbar de 2,0 mL, utilizando filtro de seringa de politetrafluoretileno [PTFE] hidrofóbico com porosidade de 0,22 µm. A análise dos compostos foi feita por meio da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem [LC-MS/MS]. Para isso, um cromatógrafo Agilent modelo 1200 foi utilizado, equipado com bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostatizado. A separação cromatográfica foi feita em uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1 x 30 mm, tamanho de partícula de 3,5 µm) a 30°C. A fase móvel foi constituída de água ultrapura e metanol, previamente filtrados em membranas com 0,2 µm de porosidade, contendo 0,01% (v/v) de NH₄OH, aditivo utilizado para favorecer a formação de íons no modo negativo.

A separação cromatográfica foi feita em composição gradiente (Tabela 5), na vazão de 0,3 mL min⁻¹.

Tabela 5 – Composição da fase móvel aquosa e orgânica do método cromatográfico para o modo de ionização negativo.

Tempo (min)	Fase móvel aquosa (%)	Fase orgânica (%)
0,00	70	30
5,00	20	80
6,00	20	80
11,00	70	30
16,00	70	30

A identificação e a quantificação dos compostos foram feitas por espectrometria de massas em um equipamento Agilent com triplo quadrupolo (modelo 6410B). Os compostos foram ionizados em uma fonte de *electrospray* no modo negativo e foram monitorados pelo modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), de acordo com os parâmetros descritos (Tabela 6). As curvas analíticas foram construídas de acordo com a área obtida para cada composto em função de sua concentração. Os limites de detecção [LD] e quantificação [LQ] instrumentais foram obtidos pela relação sinal/ruído do equipamento (Tabela 7). Para o LD utilizou-se uma razão sinal/ruído igual a 3 e para o LQ foi utilizada uma razão sinal/ruído igual a 10. O coeficiente de determinação (R^2) foi obtido a partir das curvas analíticas.

Tabela 6 – Parâmetros da espectrometria de massas para os compostos analisados.

Analito	Transição Íon precursor → Íon produto (m/z)	Energia de fragmentação (V)	Energia de colisão (V)
2,4-D	220,9 → 163	70	12
	218,9 → 161	70	14
	218,9 → 125	70	18
2,4-D- ¹³ C ₆	227,5 → 169,3	70	5
	227,5 → 167,3	70	5
Fipronil	434,9 → 330	100	10
	434,9 → 250	100	15
	434,9 → 183	100	30
Fipronil- ¹³ C ₄	438,4 → 333,5	100	10
	438,4 → 250,3	100	24
Fipronil sulfeto	419 → 382,9	135	5
	419 → 313,9	135	20
	419 → 262	135	28
Fipronil sulfona	451 → 414,9	100	10
	451 → 281,9	100	28
	451 → 243,9	100	40

Tabela 7 – Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e coeficiente de determinação (R²) para os analitos.

Analito	LD (µg L ⁻¹)	LQ (µg L ⁻¹)	R ²
2,4-D	1,0	5,0	0,9984
Fipronil	0,05	0,1	0,9977
Fipronil sulfide	0,1	0,5	0,9984
Fipronil sulfona	0,05	0,1	0,9992

5.2.2. Análises de agrotóxicos em amostras de plantas

As amostras de plantas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente trituradas em triturador comercial com utilização de N₂ líquido. O método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) foi adaptado e utilizado para a análise das amostras (ANASTASSIADES et al., 2003; GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015). Para isso, 2,5 g de planta foram pesados em um tubo Falcon de 50 mL, nos quais, em seguida, foram adicionados 12,5 mL de H₂O ultrapura gelada. A amostra foi então homogeneizada em vortex e deixada em repouso de 20 a 40 min para a hidratação. Após esse período, 15 mL de acetonitrila fortificada

com 2,5% de ácido fórmico foram adicionados. A amostra foi homogeneizada em vortex por 1 min.

Então, foram adicionados os sais para extração (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g citrato de sódio dihidratado e 0,5 g hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado) e o tubo foi homogeneizado novamente em vortex por 1 min. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min. O volume de sobrenadante (1 mL) foi retirado e transferido para a etapa de *clean up* em outro tubo contendo 150 mg MgSO₄, 5 mg carvão ativado e 25 mg de PSA (do inglês, *primary secondary amine*). O tubo foi homogeneizado em vortex por 1 min e centrifugado a 5000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi retirada e filtrada em vial de vidro de 2,0 mL, utilizando filtro de seringa de PTFE hidrofóbico com porosidade de 0,22 µm. O extrato foi seco em fluxo de N₂ até a completa secura e então foi ressuspenso em 500 µL de fase móvel 30:70 (H₂O:MeOH) (v/v) contendo o padrão interno de 2,4-D e fipronil. A análise dos compostos foi feita por meio da utilização da técnica LC-MS/MS, utilizando cromatógrafo Agilent modelo 1200, equipado com bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostaticado. Portanto, os procedimentos subsequentes foram desenvolvidos de forma análoga aos descritos na Seção 5.2.1.

5.3. Fitotoxicidade dos agrotóxicos em plantas terrestres

Sementes sem tratamento químico foram fornecidas pela empresa Piraí Sementes[®] (Piracicaba, São Paulo, Brasil) para o desenvolvimento de trabalhos anteriores (ALVES, 2020). Dez espécies de plantas terrestres foram selecionadas, incluindo *Cajanus cajan* (*i.e.*, feijão guandu-forrageiro), *Canavalia ensiformis* (*i.e.*, feijão-de-porco), *Crotalaria juncea*, *Dolichos lablab* (*i.e.*, feijão lablab), *Lupinus albus* (*i.e.*, tremoço), *Mucuna aterrima* (*i.e.*, mucuna preta), *Mucuna pruriens* (*i.e.*, mucuna cinza) e *Raphanus sativus L.* (*i.e.*, nabo forrageiro). De acordo com o fabricante, as sementes utilizadas apresentam taxa de germinação de 60 a 75% e pureza

de 98% (Tabela 8). As espécies são classificadas como leguminosas (família Fabaceae), com exceção da crucífera *R. sativus* L. (família Brassicaceae). As espécies apresentam época ideal para plantio de outubro a novembro, com exceção das espécies *L. albus* e *R. sativus* L. (abril a maio).

Tabela 8 – Informações sobre as sementes obtidas do fornecedor (Piraí Sementes®), em relação à germinação, pureza, profundidade de semeadura, época ideal de plantio e produção de biomassa e nitrogênio.

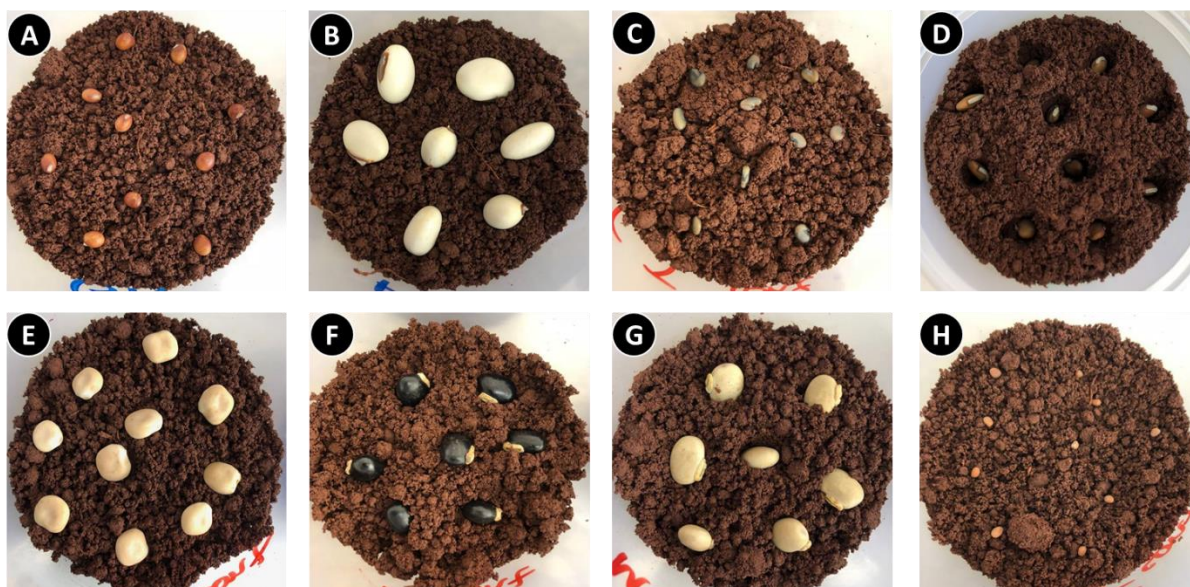
Espécies	Germinação – pureza (%)	Profundidade de plantio (cm)	Produção de biomassa (t ha ⁻¹)	Produção de nitrogênio (kg ha ⁻¹)
<i>C. cajan</i>	70 – 98	2 – 3	20 – 30	100 – 180
<i>C. ensiformis</i>	75 – 98	2 – 5	20 – 40	80 – 160
<i>C. juncea</i>	60 – 98	2 – 3	40 – 60	300 – 450
<i>D. lablab</i>	70 – 98	2 – 3	15 – 30	80 – 160
<i>L. albus</i>	75 – 98	2 – 3	20 – 30	60 – 90
<i>M. aterrima</i>	70 – 98	2 – 4	40 – 50	180 – 220
<i>M. pruriens</i>	70 – 98	2 – 4	40 – 50	180 – 220
<i>R. sativus</i>	60 – 98	1 – 2	30 – 60	20 – 30

As plantas foram escolhidas por apresentarem rápido crescimento, capacidade de fixação de nitrogênio e potencial para produção de biomassa para adubação orgânica (FLORIDO et al., 2014). Assim, essas espécies apresentam características para aplicação da fitorremediação de solos contaminados (MENDES et al., 2020; TEÓFILO et al., 2020), podendo auxiliar a ciclagem de nutrientes e recuperação da qualidade do solo. Para os ensaios, as sementes foram pré-selecionadas, com tamanhos e formas homogêneas para todos os tratamentos. Além disso, evitou-se a escolha de sementes com deformidades, quebradas ou com coloração diferente.

Na primeira etapa, ensaios preliminares foram feitos apenas com o 2,4-D, pois efeitos mais significativos eram esperados devido ao modo de ação herbicida. As oito espécies foram avaliadas quando expostas à dosagem recomendada de 2,4-D (Figura 6), com dosagem do herbicida referente ao recomendado para o cultivo de cana-de-açúcar, com concentração de 4,7

mg i.a. kg⁻¹ solo. Para o desenvolvimento dos ensaios de fitotoxicidade, o solo de estudo foi preparado com 20% de umidade. Para isso, água destilada foi utilizada como matriz de diluição dos contaminantes para os seus respectivos tratamentos. Após a contaminação, 300 g de solo foram colocados em potes plásticos de poliestireno (400 mL), considerando 4 réplicas para cada tratamento. Para as espécies testadas, foram plantadas dez sementes em cada unidade, com exceção de *C. ensiformis*, *M. aterrima* e *M. pruriens*, nas quais foram adicionadas apenas sete sementes devido ao tamanho delas.

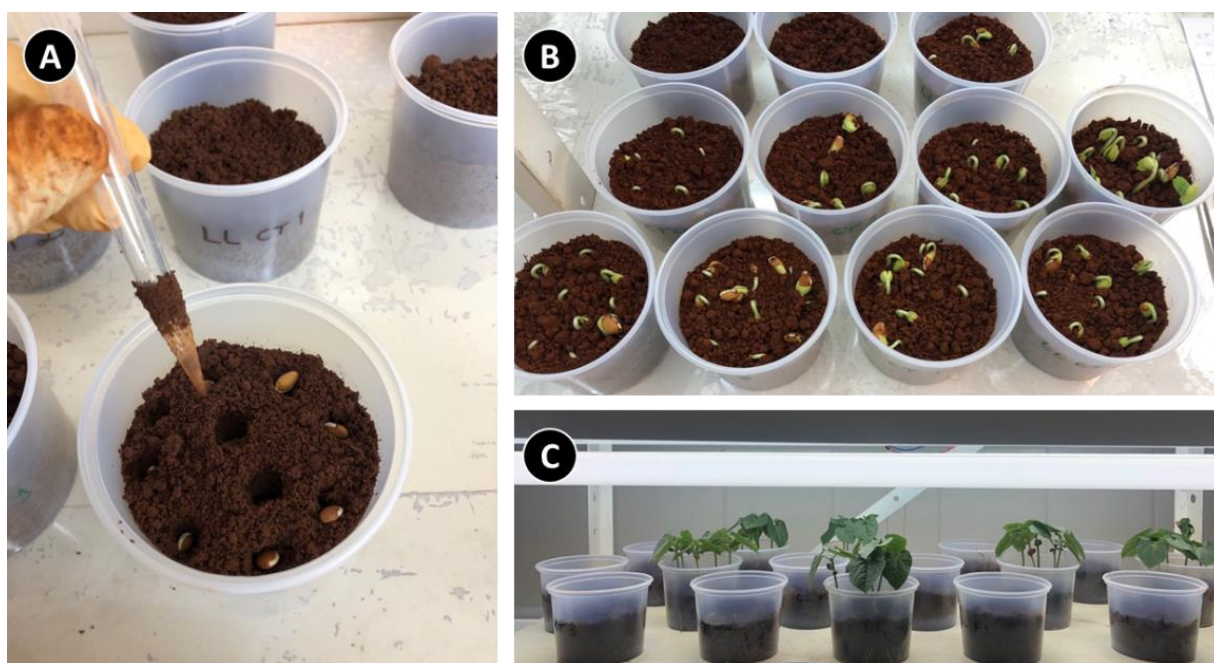
Figura 6 – Disposição das sementes de *Cajanus cajan* (A), *Canavalia ensiformis* (B), *Crotalaria juncea* (C), *Dolichos lablab* (D), *Lupinus albus* (E), *Mucuna aterrima* (F), *Mucuna pruriens* (G) e *Raphanus sativus* (H).



Em cada unidade experimental, as sementes da respectiva planta foram colocadas aproximadamente 2 cm abaixo da superfície (Figura 7). Os testes de emergência e crescimento, adaptados da ISO 11269-2 (ISO, 2012), foram feitos a 25 ± 2 °C, com luminosidade artificial (4500 lx) e fotoperíodo de 12h:12h (temporizador automático). Irrigação manual com água destilada manteve aproximadamente 20% de umidade do solo, conforme diferença de peso em um solo controle sem plantas. A duração dos experimentos foi de 21 dias após a germinação de 50% dos organismos do controle. O desbaste foi feito mantendo apenas cinco plantas em

cada unidade experimental após a germinação. As plantas foram monitoradas regularmente (i.e., a cada dois dias), para identificar possíveis efeitos dos contaminantes em seu desenvolvimento, tais como o amarelamento, engruvinhamento, necrose, clorose, queima, redução do porte e morte (AMIN et al., 2013). Os *endpoints* avaliados foram germinação, comprimento da parte aérea (i.e., comprimento entre o meristema apical e a folha mais alta), tamanho da raiz e biomassa fresca e seca de parte aérea e raiz.

Figura 7 – Plantio das dez sementes (A), emergência das plantas (B) e disposição aleatória do experimento (C) de fitotoxicidade com *Dolichos lablab* das amostras de solo contaminados com fipronil, 2,4-D e mistura.



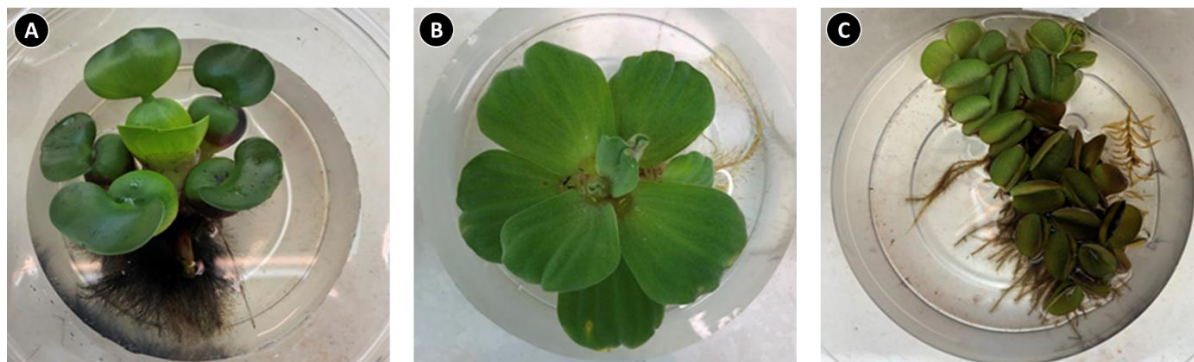
Para ensaios de mistura dos agrotóxicos, três plantas foram avaliadas, incluindo as espécies *C. ensiformis*, *D. lablab* e *L. albus*. A espécie *C. ensiformis* foi escolhida como representante das espécies de maior tamanho e produção de biomassa (e.g., *M. pruriens* e *M. aterrima*), *D. lablab* foi escolhida pelo crescimento rápido (i.e., emergência das plântulas em dois dias) e *L. albus* foi escolhida devido à sensibilidade ao 2,4-D, conforme ensaios preliminares. Nesse cenário, além do tratamento controle (i.e., sem contaminação), cinco concentrações de 2,4-D e fipronil foram selecionadas respeitando a dosagem máxima

recomendada para cada agrotóxico (4,70 e 1,05 mg kg⁻¹, respectivamente). Os ensaios foram desenvolvidos com quatro réplicas (n = 4), considerando modelo *full factorial* 6 x 6 para estabelecer os tratamentos estudados (n = 36). O solo foi contaminado com as soluções estoque dos agrotóxicos estudados conforme a proporção desejada. Análises químicas foram feitas para a quantificação dos agrotóxicos nas amostras de solo contaminado, considerando uma amostra composta para cada mistura 1:1 (i.e., os cinco tratamentos com a mesma proporção de 2,4-D e fipronil) e para o controle não-contaminado.

5.4. Fitotoxicidade dos agrotóxicos em plantas aquáticas

Três espécies de macrófitas aquáticas foram selecionadas, incluindo *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia auriculata* (Figura 8). Essas espécies possuem ampla ocorrência em áreas tropicais da América do Sul e têm sido comumente utilizadas em estudos de fitorremediação. O cultivo das macrófitas foi feito em mesocosmos de 1500 L com águas subterrâneas não contaminadas e nutrientes NPK (i.e., nitrogênio, fósforo e potássio) sob condições ambientais. Antes dos experimentos, as macrófitas foram lavadas com água de poço não contaminada e desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 10%. As macrófitas foram aclimatadas antes de cada experimento em solução de Hoagland a 10% como meio nutricional (HOAGLAND e ARNOLD, 1950). Os organismos foram mantidos por sete dias em uma sala com condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), luminância (4000 lx) e fotoperíodo (12h:12h).

Figura 8 – Plantas aquáticas utilizadas na presente pesquisa, incluindo *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia auriculata*.



A fitotoxicidade das plantas quando expostas aos agrotóxicos foi avaliada para as três espécies expostas ao 2,4-D e ao fipronil apenas de maneira isolada, com quatro réplicas por tratamento ($n = 4$). Os testes foram feitos em sala com controle de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), luminosidade 4000 lx, fotoperíodo 12:12h e tiveram duração de sete dias. Os ensaios foram montados com recipientes de plástico atóxico, com volume total de 1,0 L, considerando quatro réplicas ($n = 4$). Com base em ensaios preliminares, cinco concentrações de cada agrotóxico, além do controle não contaminado, foram estabelecidas para cada planta estudada. Ao final do período de exposição, as macrófitas foram avaliadas em relação ao comprimento das raízes e da parte aérea, além da biomassa fresca das raízes e da parte aérea.

5.5. Organismos bioindicadores

Os organismos bioindicadores utilizados na presente pesquisa foram selecionados conforme a sensibilidade aos agrotóxicos 2,4-D e fipronil. Estudos anteriores já indicaram a sensibilidade da espécie nativa neotropical *C. silvestrii* aos agrotóxicos estudados, especialmente quando exposta ao fipronil (SILVA et al., 2020, 2021). Os cladóceros *C. dubia* e *D. similis*, outras duas espécies sensíveis a vários contaminantes, também foram utilizados como forma de comparação. Além disso, a espécie nativa de inseto *C. sancticaroli* foi

considerada representativa dos organismos bentônicos, uma vez que se apresentou sensível ao fipronil (PINTO et al., 2021b). Por outro lado, espécies vegetais dicotiledôneas apresentam maior sensibilidade ao 2,4-D, pelo seu modo de ação herbicida, sendo que a hortaliça *E. sativa* L. foi a espécie escolhida para os ensaios de germinação de sementes (FREITAS et al., 2022a; OGURA et al., 2022a).

5.5.1. Cultivo da microalga *Raphidocelis subcapitata*

A microalga cloroficea cosmopolita *R. subcapitata* foi cultivada para alimentação das culturas de cladóceros, no laboratório do NEEA-USP. Os cultivos foram feitos conforme as recomendações da norma ABNT NBR 12648:2018 (ABNT, 2018). O meio de cultura L. C. Oligo foi preparado em frasco *Erlenmeyer* de 3,0 L. Após a adição das soluções que compõem o meio, o pH foi corrigido para valores entre 7,0 e 7,2 e o frasco foi tampado com gaze, algodão, papel alumínio e fita adesiva com marcação térmica. Em seguida, o meio foi disposto em autoclave por 15 min após atingir a temperatura de 120 °C. Então, o meio resfriou à temperatura ambiente (*overnight*).

O repique das algas para aumento do volume do cultivo foi feito em ambiente esterilizado (i.e., com bico de *Bunsen*). Pipetas e ponteiras foram expostas à radiação ultravioleta, assim como outros materiais que não podem ser colocados em autoclave. Os inóculos foram feitos com o cultivo em fase exponencial de crescimento, com proporção referente à contagem feita em câmara de *Neubauer*, na qual foi feita leitura de 25 câmaras em duplicata. O valor médio das contagens foi utilizado para a determinação da concentração da cultura e o volume correspondente à concentração de 10^5 células mL⁻¹ foi adicionado em 100 mL de meio de cultura em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL. Durante o período de 7 dias, agitação constante foi mantida entre 100 e 175 rpm a 25°C e luz artificial 4.500 lx e iluminação contínua (24 h).

5.5.2. Cladóceros: *Ceriodaphnia silvestrii*, *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia similis*

Os cultivos dos cladóceros das espécies *C. silvestrii*, *C. dubia* e *D. similis* foram feitos no laboratório do NEEA-USP. Os organismos-teste das três espécies foram utilizados para avaliação da ecotoxicidade aguda (48 h) e *C. silvestrii* foi utilizada para avaliação da ecotoxicidade crônica (8 dias) conforme a NBR 12713 (ABNT, 2016) e NBR 13373 (ABNT, 2017). Os organismos das espécies *C. silvestrii* e *C. dubia* foram mantidos em béqueres de 1 L cobertos com vidro de relógio, em sala climatizada com temperatura de 25 °C e fotoperíodo 12h:12h. Os organismos da espécie *D. similis* foram cultivados em béqueres de 2 L cobertos com vidro de relógio, em sala climatizada com temperatura de 20 °C e fotoperíodo 18h:6h. A água de poço não contaminada foi reconstituída, com pH variando de 7,0 a 7,6 (pHmetro B374 – Micronal) e dureza de 40 a 48 mg CaCO₃ L⁻¹. renovada três vezes na semana. A alimentação dos organismos foi feita com uma mistura da alga *R. subcapitata*, a uma densidade de aproximadamente 6 x 10⁴ células L⁻¹, e alimento composto (i.e., leveduras e ração de peixes fermentada) na concentração de 1 mL L⁻¹.

A sensibilidade das espécies *C. silvestrii* e *C. dubia* foi avaliada com a substância de referência NaCl, enquanto *D. similis* foi avaliada com KCl, conforme a carta-controle do NEEA-USP. Os testes de ecotoxicidade aguda foram feitos com o *endpoint* de imobilidade dos organismos, conforme procedimentos descritos nas normas (ABNT, 2016, 2017). Para *C. silvestrii* e *C. dubia*, copos plásticos atóxicos de 50 mL foram preenchidos com 10 mL da amostra e foram adicionados cinco neonatos (i.e., organismos entre 20 e 24 h de idade padronizados durante toda a pesquisa). Para *D. similis*, esse procedimento foi feito de forma análoga, sendo que os copos plásticos foram preenchidos com 15 mL da amostra. Os controles dos experimentos foram feitos com o meio de cultivo e os testes foram validados com imobilidade inferior a 20% no controle. Os ensaios tiveram duração de 48 h e foram mantidos

a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (*C. silvestrii* e *C. dubia*) ou $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (*D. similis*), com fotoperíodo de 12h:12h (*C. silvestrii* e *C. dubia*) ou 18h:6h (*D. similis*) e luminosidade artificial entre 100 e 1000 lx.

Para a avaliação da ecotoxicidade crônica, os ensaios foram feitos apenas para a espécie *C. silvestrii*, conforme a NBR 13373 (ABNT, 2017), uma vez que foi considerada a espécie mais sensível aos agrotóxicos estudados. Os copos plásticos de 50 mL foram preenchidos com 15 mL de amostra e um organismo neonato foi adicionado. Para cada condição avaliada, foram estabelecidas dez réplicas. O teste teve duração de sete dias, à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12h:12h e luminosidade artificial entre 100 e 1000 lx, com adição de ração fermentada (fermento biológico e ração de peixe Tetramin®) e 1×10^5 células mL^{-1} da alga *R. subcapitata*. A reprodução dos organismos foi avaliada como *endpoint* desse experimento. Os ensaios foram considerados válidos com imobilidade inferior a 20% dos organismos presentes na amostra controle e com reprodução média de neonatos igual ou superior a 15 no controle.

5.5.3. *Chironomus sancticaroli*

Os testes de toxicidade aguda com o macroinvertebrado bentônico *C. sancticaroli*, cultivados no NEEA-USP, com base no trabalho de Fonseca (1997), foram feitos em potes plásticos atóxicos de 400 mL, contendo 240 mL de elutriato e 60 g de sedimento artificial. O controle foi feito com água de cultivo e sedimento artificial, constituído por areia lavada calcinada a 520°C por 1 h (FONSECA, 1997). Seis organismos foram adicionados por amostra, entre o 2º e 3º instar de desenvolvimento (VIVEIROS, 2012), com quatro réplicas por tratamento. Os experimentos tiveram duração de 96 h e, caso as condições de oxigênio dissolvido não estivessem satisfatórias (abaixo de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$), foi feita aeração das amostras após 48 h do início. O ensaio foi desenvolvido a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12h:12h, com iluminação artificial de 100 a 1000 lx. Os testes foram validados quando a mortalidade dos organismos presentes no controle foi menor que 30%.

5.5.4. Germinação de sementes: *Eruca sativa* L.

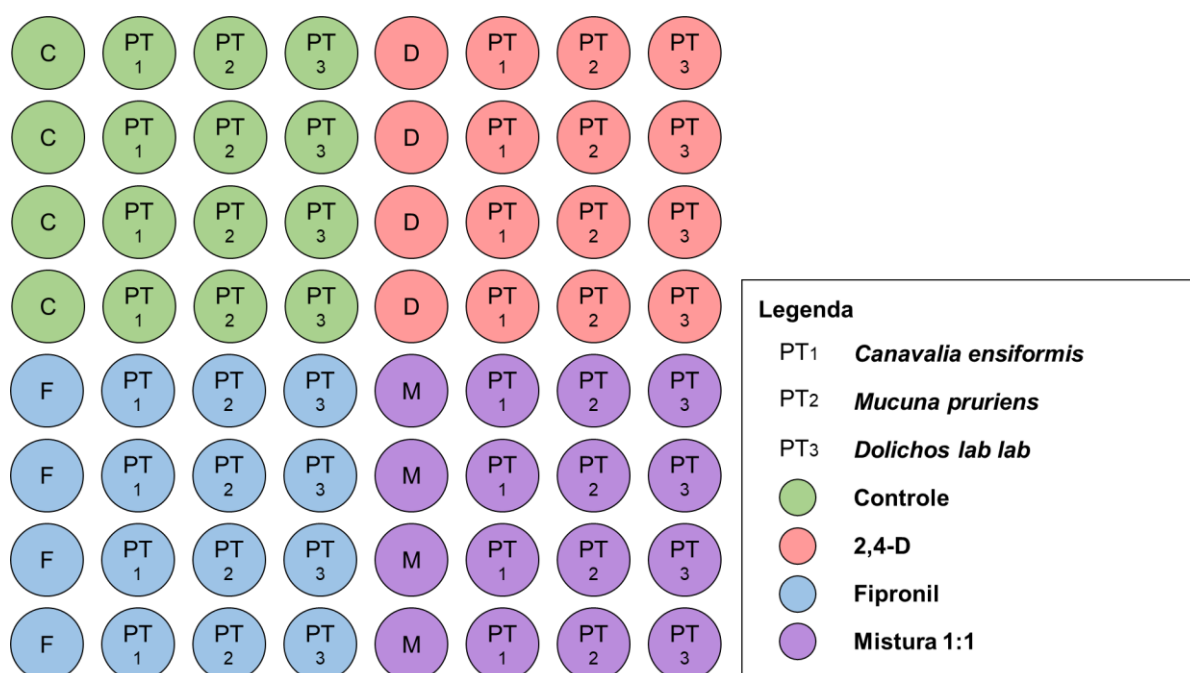
Os testes de germinação de sementes de *E. sativa* L. (com potencial de germinação de 98%, segundo o fabricante Feltrin[®]) foram adaptados do protocolo da USEPA (1996b), conforme apresentado em trabalhos anteriores (FREITAS et al., 2022a; OGURA et al., 2022a). Os ensaios consistiram em 3 réplicas para cada tratamento avaliado. Para os ensaios com amostras de água, feitos em placas de Petri, um papel filtro esterilizado foi colocado como meio suporte e, em seguida, 1,0 mL da amostra de água foi colocado para umidificar a placa. Em cada placa, 10 sementes da espécie estudada foram colocadas. Esses testes foram mantidos na ausência de luz por 96 h a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Assim, a validação ocorreu com mais de 70% de germinação nas amostras controle. A porcentagem de germinação e os comprimentos da parte aérea e da raiz foram os *endpoints* para avaliar os efeitos ecotoxicológicos.

5.6. Fitorremediação de solos contaminados com agrotóxicos

Três espécies de plantas terrestres foram selecionadas para os ensaios de fitorremediação (n = 4 réplicas) de solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D [D] e fipronil [F] isolados e em mistura [M] (na proporção 1:1), considerando um controle de laboratório [C] (ou seja, sem contaminação), incluindo *Canavalia ensiformis* [PT1], *Mucuna pruriens* [PT2] e *Dolichos lablab* [PT3] (Figura 9). As concentrações-alvo iniciais no solo foram de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para os dois agrotóxicos, como sendo uma concentração que não causaria efeitos para as plantas utilizadas (conforme os resultados da Seção 5.2). Os testes foram feitos de forma análoga aos procedimentos apresentados para os ensaios de fitotoxicidade (Seção 5.2), em potes plásticos atóxicos de 1 L preenchidos com 1 kg de solo. Em cada unidade experimental, 10 sementes foram adicionadas. Após a emergência das plântulas, apenas cinco plantas foram mantidas por réplica. O experimento, em laboratório, teve duração de 30 dias, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, luz artificial

(aproximadamente 4500 lx) e fotoperíodo de 12h:12h. A umidade do solo foi mantida em 20% durante todo o experimento por irrigação manual.

Figura 9 – Desenho experimental dos ensaios de fitorremediação de solos contaminados, considerando três plantas terrestres. Os tratamentos avaliados, com quatro réplicas, foram o controle, o 2,4-D, o fipronil e a mistura dos dois agrotóxicos (proporção 1:1).



Ao final do período de crescimento, as plantas foram removidas e lavadas em água corrente para retirar o excesso de solo. O solo das quatro réplicas foi homogeneizado e as concentrações residuais de 2,4-D e fipronil foram determinadas por análise química (conforme procedimentos descritos na Seção 5.2.1). A biomassa vegetal, da parte aérea e da raiz, foi seca e processada para as análises químicas dos agrotóxicos bioacumulados (conforme procedimentos descritos na Seção 5.2.2).

Em seguida, os elutriatos das amostras de solo após o experimento de fitorremediação foram preparados na proporção de 1:4 solo-água (Figura 10), sendo que foram adicionados 40 g de solo e 160 mL de água de poço não contaminada em um frasco Erlenmeyer de 250 mL

(ANTUNES et al., 2010). As amostras foram submetidas à agitação constante de 150 rpm por 12 h e, em seguida, permaneceram em repouso por mais 12 h. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios de ecotoxicidade, sendo que as avaliações do elutriato foram feitas comparando a toxicidade das amostras com e sem plantas, utilizando os bioindicadores selecionados na Etapa 5.5 (i.e., *E. sativa* L., *C. silvestrii*, *C. dubia*, *D. similis* e *C. sancticaroli*). Para a espécie *C. sancticaroli*, as amostras de solo foram utilizadas como sedimento dos ensaios de ecotoxicidade aguda, como forma de comparar os resultados.

Figura 10 – Preparo do elutriato 1:4 (A) e disposição das amostras para ensaios ecotoxicológicos com *C. sancticaroli* (B) após experimento de fitorremediação.



A escolha pela avaliação das amostras de elutriato foi decorrente da padronização dos organismos-teste para os experimentos com água e solo ao longo da presente pesquisa. Além disso, para as concentrações testadas e quantificadas após a fitorremediação, efeitos tóxicos não eram esperados para os organismos-teste disponíveis no laboratório do NEEA-USP, incluindo os colêmbolos da espécie *Folsomia candida* e os enquitreídeos da espécie *Enchytraeus crypticus* (TRIQUES et al., 2021).

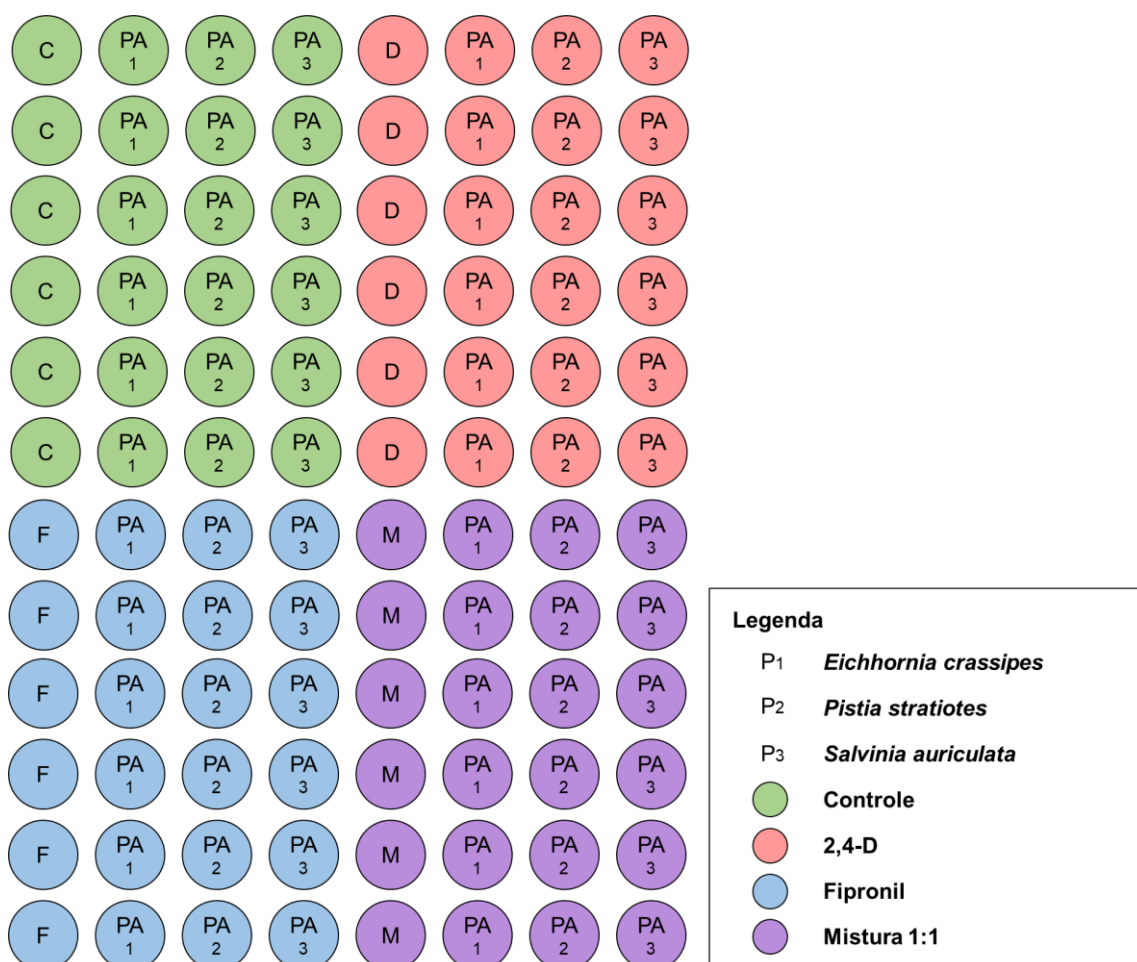
5.7. Fitorremediação de águas contaminadas com agrotóxicos

Os procedimentos de cultivo e aclimação de macrófitas para os experimentos de fitorremediação seguiram o mesmo protocolo apresentado para os ensaios de fitotoxicidade (Seção 5.4). Entretanto, após a aclimação, o meio de cultura selecionado foi o Taub T82MV para o desenvolvimento dos ensaios (USEPA, 1996a). Os experimentos foram feitos em recipientes plásticos de poliestireno de 1 L atóxicos. As concentrações-alvo foram $223,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o 2,4-D e $31,8 \mu\text{g L}^{-1}$ para o fipronil, equivalentes à metade da PEC estimada em estudos anteriores (FREITAS et al., 2022b; OGURA et al., 2022a; PINTO et al., 2021a; SILVA et al., 2021). O cenário de contaminação em mistura ocorreu na proporção 1:1 dos tratamentos com 2,4-D e fipronil.

As plantas aquáticas selecionadas foram *Eichhornia crassipes* [PA1], *Pistia stratiotes* [PA2] e *Salvinia auriculata* [PA3]. Os tratamentos para cada espécie selecionada consistiram em seis réplicas ($n = 6$) de um controle de laboratório [C] (ou seja, sem contaminação) e água contaminada com 2,4-D [D], fipronil [F] e uma mistura dos dois agrotóxicos [M] (Figura 11). As seis réplicas foram estabelecidas para geração de um número de amostras suficiente para o desenvolvimento dos testes pós-fitorremediação, além de facilitar a análise do crescimento das plantas. Um organismo padronizado foi colocado aleatoriamente em cada microcosmo. Para PA1, seis frondes e comprimento de raiz de 7,0 a 10,0 foram considerados. Cada PA2 tinha quatro frondes e raiz de 6,0 a 10,0 cm. Por fim, PA3 apresentou dez frondes e comprimento de raiz entre 5,5 e 9,0 cm. Além disso, foi estabelecido um controle negativo (i.e., sem as plantas) para cada cenário de contaminação a fim de avaliar eventual degradação dos agrotóxicos desconsiderando o papel das macrófitas. Após 7 dias de exposição, os parâmetros de crescimento das macrófitas foram avaliados: comprimento de raízes e brotos, número de frondes e raízes e biomassa fresca. Os parâmetros de qualidade da água foram medidos antes e

após os experimentos, incluindo pH (Micronal® B374), condutividade elétrica (Orion® 145A) e oxigênio dissolvido (YSI® 55-25 ft).

Figura 11 – Desenho experimental dos ensaios de fitorremediação de águas contaminadas, considerando três plantas aquáticas. Os tratamentos avaliados, com quatro réplicas, foram o controle, o 2,4-D, o fipronil e a mistura dos dois agrotóxicos (proporção 1:1).



5.8. Análise dos dados

Os testes de Shapiro-Wilk e Levene verificaram, respectivamente, a normalidade e homogeneidade dos dados. Para os ensaios de fitotoxicidade e fitorremediação, a Análise de Variância [ANOVA] de Medidas Repetidas, seguida do teste *post hoc* de Tukey e de Dunnett, comparou as diferenças entre os tratamentos. Diferenças significativas foram estabelecidas entre as amostras controle e contaminadas quando houve significância estatística ($p < 0,05$).

As concentrações de efeito [CE_x] para os testes de sensibilidade e os testes de toxicidade aguda foram obtidas pelos programas *Statistica 7* e *SigmaPlot*. As EC_x foram calculadas por regressão não-linear pelo modelo da curva logística, com intervalo de confiança de 95%. Por exemplo, esse procedimento foi aplicado para estimar a concentração de efeito a 50% dos organismos [CE₅₀]. Para os ensaios de fitotoxicidade, os valores médios dos diferentes tratamentos foram comparados para avaliação dos efeitos dos agrotóxicos. Para cada contaminante isolado, as concentrações de efeito foram calculadas em termos de 50, 20 e 10% de inibição do crescimento (IC₅₀, IC₂₀ e IC₁₀, respectivamente). O Índice de Tolerância [IT] indicou a resistência da planta de acordo com o controle não-contaminado.

Para os ensaios de fitorremediação, três fatores foram utilizados para avaliar o potencial de acumulação dos agrotóxicos nas plantas terrestres e aquáticas estudadas. O fator de bioconcentração [FBC], o fator de bioacumulação [FBA] e o fator de translocação [FT] foram calculados conforme a Equação 1, Equação 2 e Equação 3, respectivamente (NAZ et al., 2020). Valores de FBC e FBA acima de 1,0 representam plantas hiperacumuladoras, ou seja, plantas que são capazes de bioacumular os contaminantes em relação às concentrações do meio. Valores de FT acima de 1,0 correspondem às plantas capazes de translocar os agrotóxicos da raiz para a parte aérea.

$$FBC = \frac{\text{Concentração}_{raiz}}{\text{Concentração}_{solo\ ou\ água}} \quad \text{Equação 1}$$

$$FBA = \frac{\text{Concentração}_{raiz} + \text{Concentração}_{parte\ aérea}}{\text{Concentração}_{solo\ ou\ água}} \quad \text{Equação 2}$$

$$FT = \frac{\text{Concentração}_{parte\ aérea}}{\text{Concentração}_{raiz}} \quad \text{Equação 3}$$

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

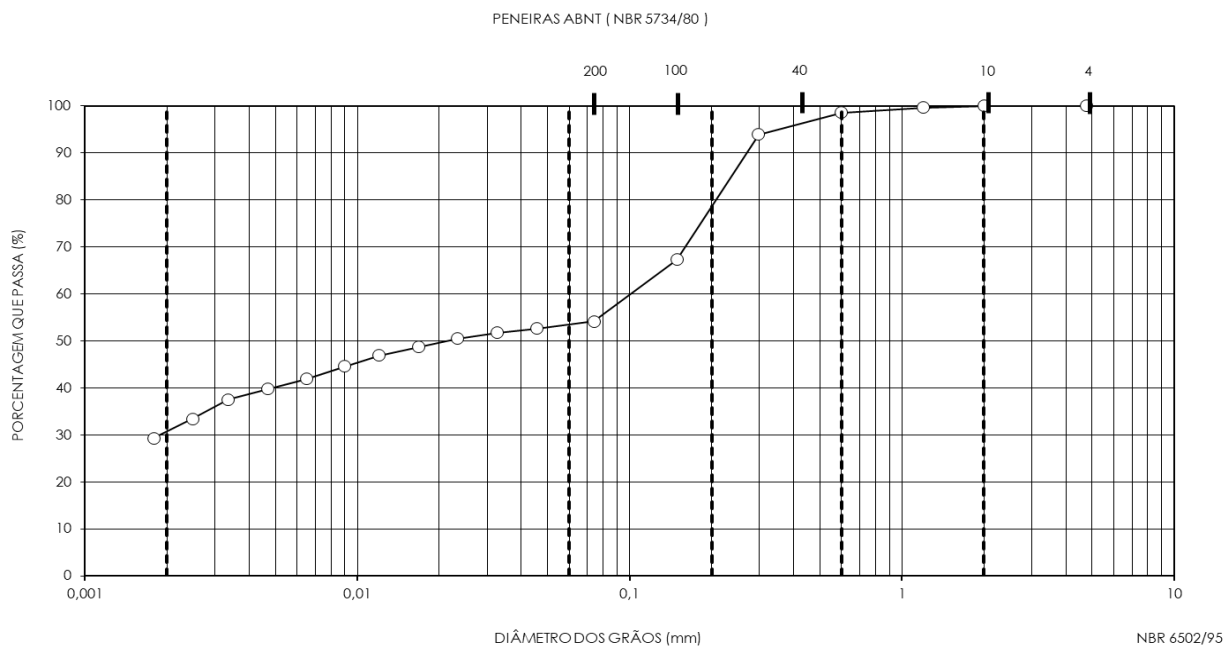
6.1. Caracterização das matrizes estudadas

Os resultados de caracterização física e química do solo coletado foram apresentados na Tabela 9. De acordo com as características granulométricas (i.e., 31,9% de argila, 21,7% de silte, 46,4% de areia), o solo pode ser caracterizado como Latossolo vermelho (Oxissolo) (Figura 12). O solo coletado apresentou pH 5,2, 11% de matéria orgânica, densidade de 1,48 g cm³ e CTC de 3,47 cmol_c kg⁻¹. Vale ressaltar que resíduos de 2,4-D e fipronil não foram detectados nas amostras de solo coletado e, portanto, o controle dos experimentos foi caracterizado pela ausência de contaminação pelos agrotóxicos estudados. Dentre os metais avaliados em um trabalho anterior com o mesmo solo de estudo (FIGUEIRÊDO, 2019), cádmio, cobre, níquel e zinco estiveram abaixo do limite de detecção (0,1 mg kg⁻¹); por outro lado, chumbo (0,037 mg kg⁻¹), cromo (12,33 mg kg⁻¹), ferro (26,06 mg kg⁻¹) e manganês (5,71 mg kg⁻¹) estiveram acima do respectivo limite de detecção. Nesse mesmo estudo, também foram quantificados nitrogênio (1,82%), fósforo (2,07 µg g⁻¹), extrato húmico total (1,366% m/m), ácido húmico (0,452% m/m) e ácido fúlvico (0,914% m/m).

Tabela 9 – Caracterização do solo coletado na área do NEEA/CRHEA/EESC/USP.

Granulometria			
Argila [$< 0,002$ mm] (%)	31,9	Areia fina [$0,06 - 0,2$ mm] (%)	24,8
Silte [$0,002 - 0,06$ mm] (%)	21,7	Areia média [$0,2 - 0,6$ mm] (%)	20,2
Areia [$0,06 - 2,0$ mm] (%)	46,4	Areia grossa [$0,6 - 2,0$ mm] (%)	1,4
Parâmetros físicos e químicos			
pH (H ₂ O)	5,2	pH (KCl)	4,8
Potencial de oxirredução [Eh] (mV)	228,8	Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	50,1
Densidade (g cm ³)	1,48	Índice de vazios	1,05
Umidade média (%)	14,6	Porosidade (%)	55
Massa específica aparente (g cm ³)	1,28	Massa específica real (g cm ³)	2,83
Grau de saturação (%)	31	Capacidade de troca catiônica (cmol _c kg ⁻¹)	3,47
Matéria orgânica (%)	11,4	Matéria orgânica (g kg ⁻¹)	114,3

Figura 12 – Análise granulométrica do solo de estudo, conforme a porcentagem que passa (%) pelas peneiras estabelecidas pela NBR 5734/80 (ABNT, 1980).



Quanto maior a área superficial das partículas do solo, maior a capacidade de sorção de minerais e contaminantes (LANGMUIR, 1997). Portanto, a fração argilosa do solo de estudo (31,9%) contribui para a sorção dos contaminantes estudados. Dessa forma, a granulometria pode favorecer as interações entre os agrotóxicos e o solo, tornando-os menos disponíveis. Por consequência da retenção de contaminantes no solo, as matrizes do elutriado apresentariam menor concentração de agrotóxicos do que solos menos argilosos. A maior sorção de fipronil no solo está associada à maior presença de matéria orgânica e quando ocorre a diminuição da relação solo/água, devido à sua baixa solubilidade (BOBÉ et al., 1997).

Tabela 10 – Parâmetros físicos e químicos na água coletada no poço do CRHEA/EESC/USP e da água utilizada para o cultivo e ensaios com cladóceros utilizados na presente pesquisa.

Parâmetros	Água do poço	Água para o cultivo de cladóceros
pH	7,7 ± 0,2	6,8 ± 0,5
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	120,2 ± 10,0	155,3 ± 23,8
Oxigênio dissolvido (mg O ₂ L ⁻¹)	6,47 ± 0,41	7,05 ± 0,23
Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	12 ± 3	40 ± 2
Carbono total (mg L ⁻¹)	8,43 ± 0,15	8,77 ± 0,15
Carbono inorgânico (mg L ⁻¹)	5,10 ± 0,10	6,87 ± 0,06
Carbono orgânico total (mg L ⁻¹)	3,37 ± 0,15	1,97 ± 0,12

6.2. Fitotoxicidade dos agrotóxicos em plantas terrestres

6.2.1. Ensaios preliminares com o herbicida 2,4-D

Nos ensaios preliminares, oito plantas terrestres foram expostas à dosagem recomendada de 2,4-D para o cultivo de cana-de-açúcar (4,7 mg kg⁻¹). O crescimento inicial (21 dias após a germinação de 50% das plântulas presentes no controle) foi avaliado em comparação com uma condição não contaminada (controle), conforme a inibição de crescimento da biomassa fresca e seca da parte aérea e da raiz (Tabela 12).

Tabela 11 – Crescimento inicial (CI), biomassa fresca (BF) e biomassa seca (BS) da parte aérea e das raízes das plantas *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis*, *Crotalaria juncea*, *Dolichos lablab*, *Lupinus albus*, *Mucuna aterrima*, *Mucuna pruriens* e *Raphanus sativus* expostas a 4,7 mg kg⁻¹ de 2,4-D em relação à condição não contaminada (controle).

Parte aérea						
Espécies	Controle			2,4-D		
	CI (cm)	BF (g)	BS (g)	CI (cm)	BF (g)	BS (g)
<i>C. cajan</i>	6,7 ± 1,3	0,54 ± 0,23	0,12 ± 0,08	0,7 ± 0,6	0,08 ± 0,04	0,02 ± 0,01
<i>C. ensiformis</i>	27,2 ± 1,8	4,47 ± 0,12	0,88 ± 0,08	7,0 ± 5,1	1,67 ± 0,12	0,30 ± 0,05
<i>C. juncea</i>	5,6 ± 0,3	1,54 ± 0,18	0,18 ± 0,06	0,9 ± 1,3	0,67 ± 0,19	0,08 ± 0,03
<i>D. lablab</i>	8,8 ± 0,8	0,91 ± 0,22	0,14 ± 0,02	0,5 ± 0,1	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01
<i>L. albus</i>	11,9 ± 1,8	1,67 ± 0,09	0,21 ± 0,04	1,2 ± 0,2	0,41 ± 0,09	0,13 ± 0,06
<i>M. aterrima</i>	23,6 ± 2,4	2,00 ± 0,33	0,41 ± 0,08	5,2 ± 1,9	0,78 ± 0,13	0,14 ± 0,04
<i>M. pruriens</i>	22,1 ± 4,9	2,10 ± 0,28	0,34 ± 0,10	8,4 ± 3,0	1,22 ± 0,37	0,19 ± 0,03
<i>R. sativus</i>	4,3 ± 0,5	0,43 ± 0,20	0,11 ± 0,08	0,3 ± 0,3	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,01
Raiz						
Espécies	Controle			2,4-D		
	CI (cm)	BF (g)	BS (g)	CI (cm)	BF (g)	BS (g)
<i>C. cajan</i>	5,8 ± 1,8	0,45 ± 0,20	0,04 ± 0,02	0,9 ± 0,5	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
<i>C. ensiformis</i>	21,0 ± 1,0	4,33 ± 0,29	0,32 ± 0,11	8,6 ± 3,3	1,20 ± 0,23	0,19 ± 0,09
<i>C. juncea</i>	8,8 ± 0,4	0,40 ± 0,18	0,07 ± 0,02	1,3 ± 0,5	0,23 ± 0,04	0,02 ± 0,00
<i>D. lablab</i>	11,6 ± 0,3	0,50 ± 0,09	0,03 ± 0,01	0,7 ± 0,2	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<i>L. albus</i>	9,2 ± 2,8	0,77 ± 0,10	0,10 ± 0,03	0,6 ± 0,1	0,17 ± 0,03	0,04 ± 0,02
<i>M. aterrima</i>	13,7 ± 1,0	1,12 ± 0,25	0,51 ± 0,12	9,4 ± 0,7	0,78 ± 0,12	0,16 ± 0,05
<i>M. pruriens</i>	16,2 ± 0,3	1,20 ± 0,38	0,43 ± 0,11	12,8 ± 1,7	0,85 ± 0,15	0,12 ± 0,07
<i>R. sativus</i>	3,7 ± 1,5	0,38 ± 0,12	0,04 ± 0,02	0,5 ± 0,3	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01

Os IT das amostras no tratamento com 2,4-D em relação ao controle foram calculados para o crescimento inicial da parte aérea e da raiz, considerando o comprimento e as biomassas frescas e secas (Tabela 12). Ao final do experimento, *M. pruriens* foi a planta que apresentou os maiores valores de IT e, dessa forma, essa espécie foi escolhida para o ensaio de fitorremediação (Seção 6.4), conforme apresentado na sub-hipótese 2. Os efeitos de redução de crescimento da parte aérea foram perceptíveis para todas as espécies testadas, como apresentando na Figura 13. Dessa forma, foi possível indicar que houve fitotoxicidade para todas as espécies quando expostas ao 2,4-D. Na etapa seguinte (Seção 6.2.2), *C. ensiformis*, *D. lablab* e *L. albus* foram as espécies selecionadas para a avaliação dos efeitos de diferentes concentrações dos agrotóxicos de forma isolada e em mistura. Conforme a Tabela 12, *D. lablab* e *L. albus* estiveram entre as plantas com menores valores de IT. Por outro lado, *C. ensiformis* foi escolhida por apresentar maior biomassa em relação às demais espécies.

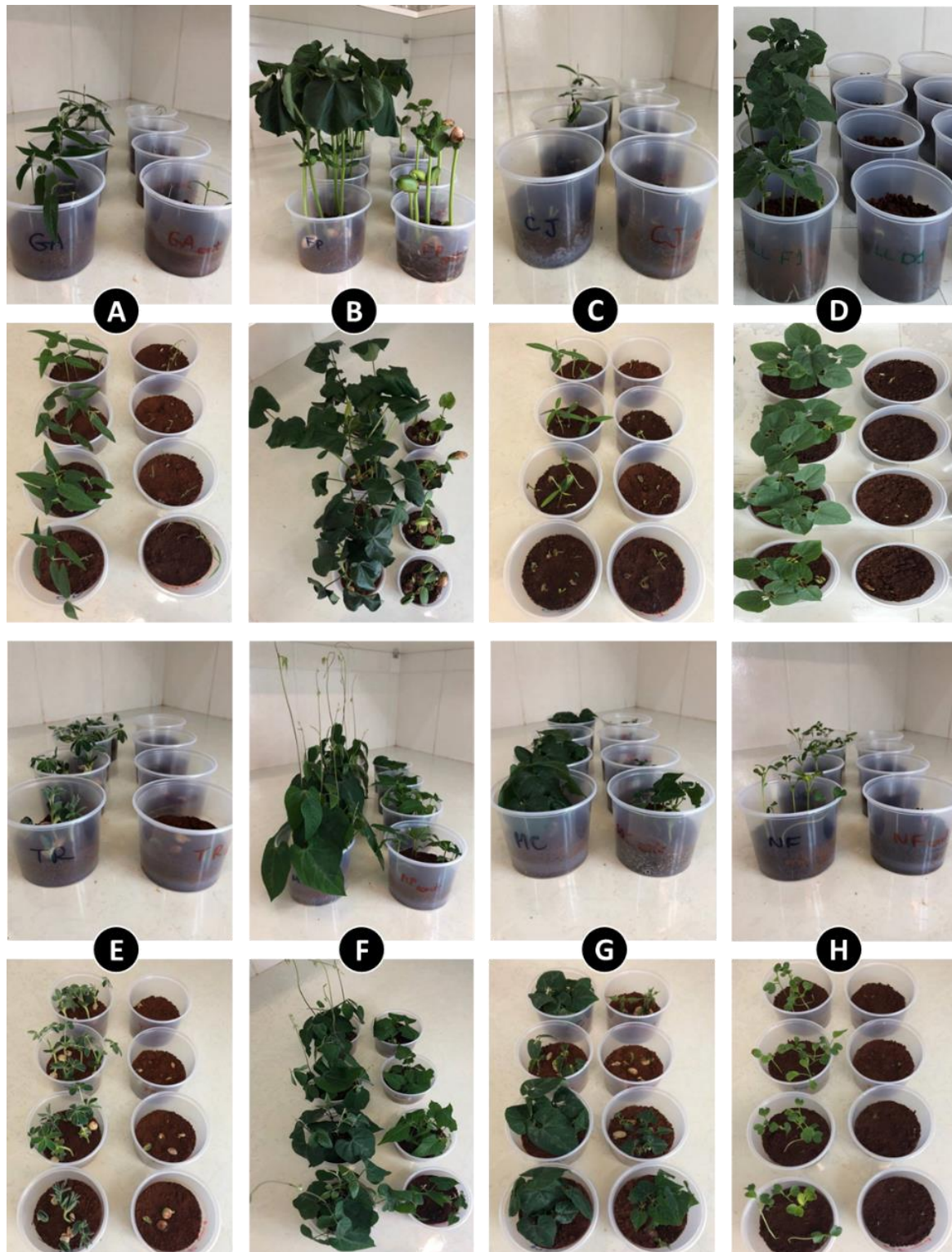
Tabela 12 – Índice de tolerância (IT) para crescimento inicial (CI) e biomassa fresca (BF) e biomassa seca (BS) das plantas *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis*, *Crotalaria juncea*, *Dolichos lablab*, *Lupinus albus*, *Mucuna aterrima*, *Mucuna pruriens* e *Raphanus sativus* expostas a 4,7 mg kg⁻¹ de 2,4-D em relação à condição não contaminada (controle).

Espécies	IT – Parte aérea (%)			IT – Raiz (%)		
	CI	BF	BS	CI	BF	BS
<i>C. cajan</i>	10,4	14,8	16,7	15,5	2,2	25,0
<i>C. ensiformis</i>	25,7	37,4	34,1	41,0	27,7	59,4
<i>C. juncea</i>	16,1	43,5	44,4	14,8	57,5	28,6
<i>D. lablab</i>	5,7	4,4	21,4	6,0	2,0	33,3
<i>L. albus</i>	10,1	24,6	61,9	6,5	22,1	40,0
<i>M. aterrima</i>	22,0	39,0	34,1	68,6	69,6	31,4
<i>M. pruriens</i>	38,0	58,1	55,9	79,0	70,8	27,9
<i>R. sativus</i>	7,0	14,0	18,2	13,5	2,6	25,0

Nota:

Valores de IT acima de 50% foram destacados em negrito.

Figura 13 – Vista frontal e superficial das unidades experimentais (controle e com 4,7 mg kg⁻¹ de 2,4-D) para avaliação do crescimento inicial de *Cajanus cajan* (A), *Canavalia ensiformis* (B), *Crotalaria juncea* (C), *Dolichos lablab* (D), *Lupinus albus* (E), *Mucuna aterrima* (F), *Mucuna pruriens* (G) e *Raphanus sativus* (H).



6.2.2. Ensaios de fitotoxicidade com os agrotóxicos em mistura

As concentrações iniciais dos agrotóxicos para a contaminação do solo foram estabelecidas conforme ensaios preliminares e os resultados foram expressos conforme as concentrações medidas pelas análises químicas. O pH das amostras de solo esteve entre 5,02 e 5,48, indicando que a adição dos agrotóxicos não interferiu no pH do solo de estudo (pH = 5,2). A condutividade do solo esteve entre 129,4 e 243,0 $\mu\text{S cm}^{-1}$, sendo que os valores não seguiram um padrão para o aumento das concentrações dos agrotóxicos. Para os ensaios de fitotoxicidade dos agrotóxicos em mistura, os resultados das análises químicas estão apresentados na Tabela 13. Mesmo no início do experimento, resíduos de fipronil sulfeto e sulfona foram detectados nas amostras de solo avaliadas, o que indica que a formulação comercial utilizada já apresentava subprodutos de degradação. Além disso, a aplicação dos agrotóxicos foi feita com homogeneização em sacos plásticos, o que pode ocasionar perdas no processo. A aplicação por *spray drift*, que é comum para o 2,4-D, e na forma granular, comum para o fipronil, possivelmente resultariam na acumulação desses agrotóxicos nas partes superficiais do solo.

Tabela 13 – Concentração dos agrotóxicos e dos subprodutos nas amostras de solo utilizadas para os ensaios de fitotoxicidade de plantas terrestres expostas à mistura dos contaminantes.

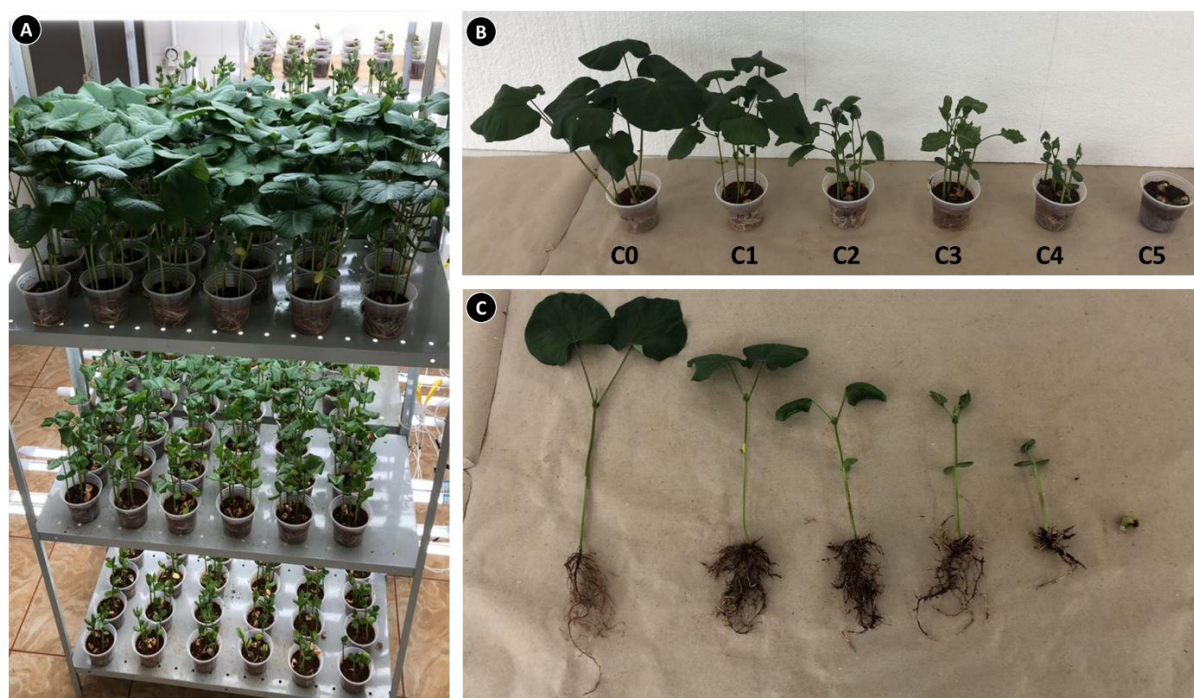
Tratamento	Concentração dos agrotóxicos e subprodutos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	2,4-D	Fipronil	Fipronil sulfeto	Fipronil sulfona
C0	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
C1	57,42	15,90	0,12	0,48
C2	144,99	31,23	0,21	0,89
C3	550,47	37,72	0,27	1,11
C4	1002,87	59,10	0,46	1,87
C5	1257,24	120,19	0,81	3,56

Nota: C0 corresponde ao controle não contaminado e C1 a C5 correspondem às diferentes concentrações de 2,4-D utilizadas.

A disposição e desenvolvimento dos ensaios de fitotoxicidade com a espécie *C. ensiformis* estão apresentados na Figura 14. O aumento das concentrações de 2,4-D, em particular, promoveu o decréscimo do comprimento da parte aérea e das raízes dos organismos

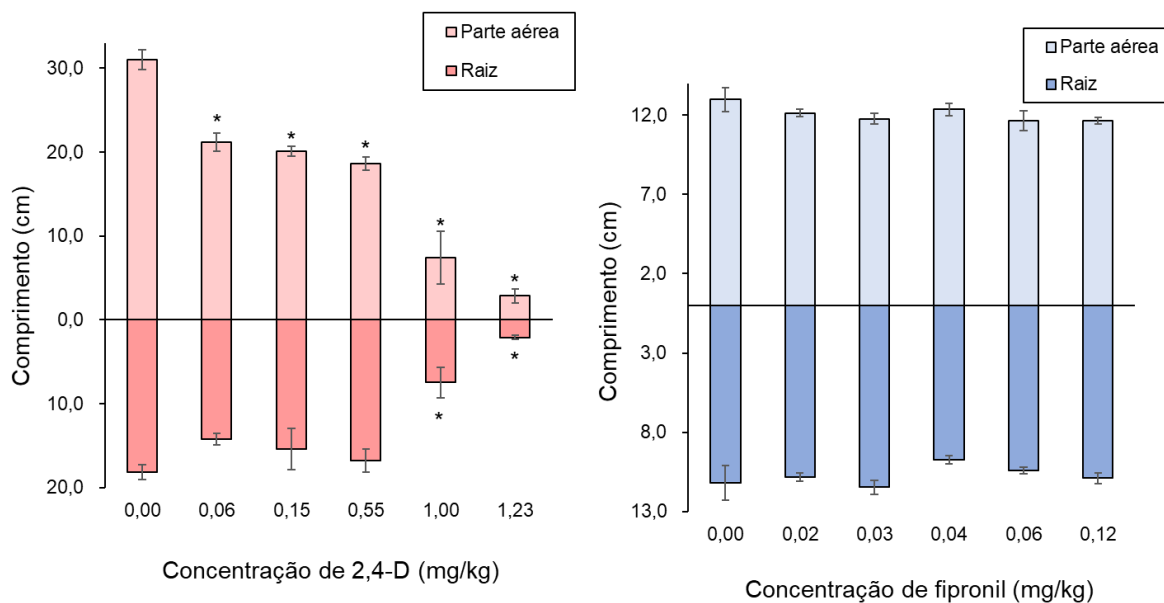
expostos. Destaca-se a redução do tamanho do caule e das folhas das plantas expostas nas duas maiores concentrações (1,00 e 1,23 mg kg⁻¹) (Figura 14). Essas duas concentrações também causaram redução significativa do comprimento das raízes das plantas expostas (Figura 15). Todas as concentrações de 2,4-D testadas promoveram decréscimo significativo do crescimento da parte aérea em relação ao controle não contaminado (ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). Por outro lado, não foram identificados efeitos de fitotoxicidade quando as plantas foram expostas a diferentes concentrações de fipronil (até 0,12 mg kg⁻¹, $p > 0,05$) (Figura 15).

Figura 14 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas *Canavalia ensiformis* quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura, com destaque para a disposição dos experimentos (A), visão geral com um pote de cada tratamento com 2,4-D isolado (n = 6) (B) e uma planta representativa de cada tratamento com diferentes concentrações de 2,4-D (C).



Nota: C0 corresponde ao controle não contaminado e C1 a C5 correspondem às diferentes concentrações de 2,4-D utilizadas (0,00, 0,06, 0,15, 0,55, 1,00 e 1,23 mg/kg, respectivamente).

Figura 15 – Crescimento inicial da parte aérea e da raiz de plantas *Canavalia ensiformis* no ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil de forma isolada.



A redução dos valores médios de porcentagem de germinação ocorreu apenas nas duas maiores concentrações de 2,4-D (1,00 e 1,23 mg kg⁻¹) e os resultados não foram influenciados pelas diferentes proporções de fipronil em mistura (Tabela 14). Da mesma forma, o aumento das concentrações de 2,4-D contribuiu para a diminuição dos valores médios de comprimento de raiz e parte aérea. Em geral, os resultados de biomassa fresca e seca da parte aérea e da raiz também apontaram efeitos mais significativos para o aumento das concentrações de 2,4-D em relação ao fipronil dentro das concentrações testadas (Tabela 15).

Tabela 14 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas *Canavalia ensiformis* expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e tamanho da raiz.

Misturas		Porcentagem de germinação (%)					
		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	0,06	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	0,15	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	0,55	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	1,00	95,0 ± 10,0	80,0 ± 28,3	75,0 ± 30,0	65,0 ± 41,2	95,0 ± 10,0	85,0 ± 30,0
	1,23	35,0 ± 19,1	80,0 ± 16,3	80,0 ± 16,3	75,0 ± 37,9	80,0 ± 40,0	95,0 ± 10,0

Misturas		Comprimento da parte aérea (cm)					
		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	31,0 ± 1,2	28,9 ± 2,0	26,7 ± 1,5	27,4 ± 1,4	27,3 ± 1,3	28,6 ± 0,6
	0,06	21,2 ± 1,1	21,5 ± 1,8	22,1 ± 1,6	22,6 ± 0,5	21,8 ± 0,9	21,5 ± 0,5
	0,15	20,1 ± 0,5	18,5 ± 2,3	19,9 ± 1,9	20,6 ± 1,2	20,7 ± 1,0	18,5 ± 2,3
	0,55	18,7 ± 0,8	19,0 ± 1,7	19,4 ± 1,3	19,0 ± 1,4	18,2 ± 1,8	16,3 ± 2,9
	1,00	7,4 ± 3,2	12,7 ± 2,1	10,0 ± 3,0	7,9 ± 3,4	11,9 ± 3,1	11,8 ± 1,1
	1,23	2,9 ± 0,9	3,1 ± 1,4	2,0 ± 1,0	2,8 ± 1,6	4,0 ± 2,9	3,7 ± 0,7

Misturas		Comprimento da raiz (cm)					
		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	18,2 ± 0,8	20,3 ± 0,7	18,1 ± 1,1	16,2 ± 0,7	16,3 ± 1,2	15,6 ± 1,2
	0,06	14,3 ± 0,7	16,0 ± 1,7	14,7 ± 0,4	14,9 ± 1,2	14,6 ± 2,0	14,1 ± 1,5
	0,15	15,4 ± 2,5	16,1 ± 1,4	15,8 ± 1,2	13,6 ± 1,3	13,0 ± 0,8	14,4 ± 1,8
	0,55	16,8 ± 1,4	15,7 ± 0,8	16,3 ± 2,2	15,7 ± 1,5	17,1 ± 2,5	14,5 ± 0,9
	1,00	7,5 ± 1,9	11,4 ± 2,6	7,9 ± 4,8	8,7 ± 5,1	9,9 ± 1,8	8,3 ± 2,4
	1,23	2,1 ± 0,3	2,9 ± 1,6	1,7 ± 0,6	1,7 ± 0,8	3,2 ± 1,8	3,5 ± 0,9

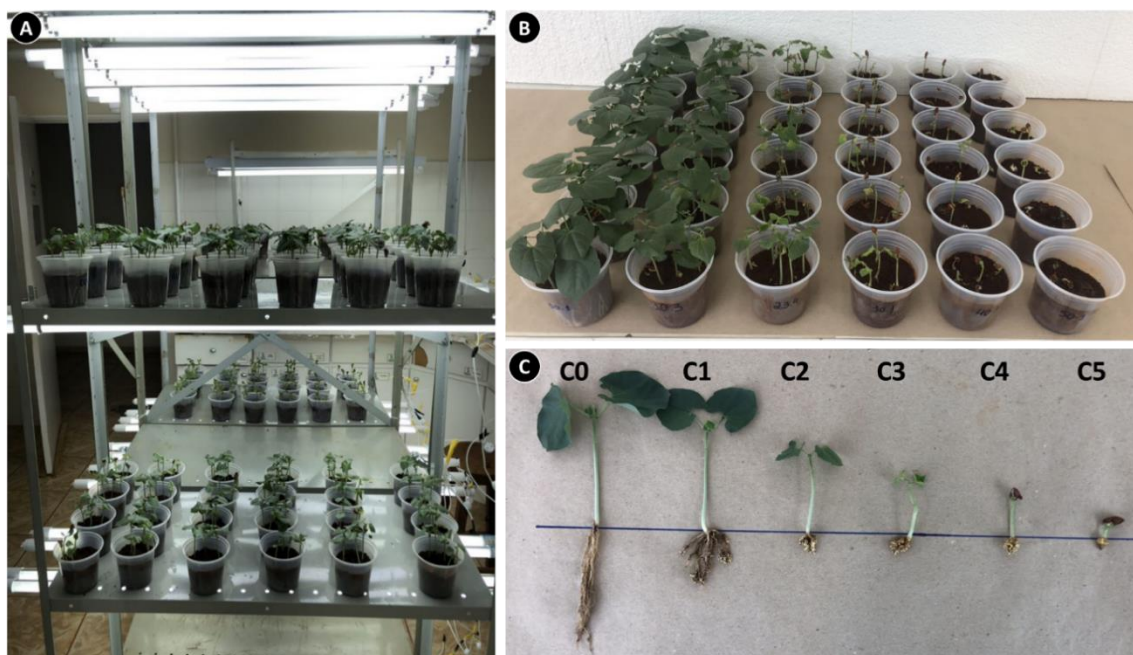
Tabela 15 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas *Canavalia ensiformis* expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando biomassa fresca e seca da parte aérea e da raiz.

		Biomassa fresca da parte aérea (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,0	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,0	4,63 ± 0,25	5,02 ± 0,20	4,15 ± 0,29	4,09 ± 0,49	4,13 ± 0,19	4,23 ± 0,12
	0,06	4,37 ± 0,20	4,06 ± 0,57	4,15 ± 0,29	4,11 ± 0,35	4,28 ± 0,11	4,51 ± 0,41
	0,15	4,46 ± 0,51	4,15 ± 0,39	4,53 ± 0,37	4,73 ± 0,58	4,23 ± 0,24	4,12 ± 0,57
	0,55	4,47 ± 0,27	4,11 ± 0,19	3,87 ± 0,90	3,88 ± 0,62	4,17 ± 0,29	4,09 ± 0,49
	1,00	3,44 ± 0,26	4,17 ± 0,67	3,47 ± 0,37	3,05 ± 1,03	3,94 ± 0,37	3,83 ± 0,40
	1,23	3,67 ± 3,84	2,94 ± 0,20	3,19 ± 0,37	3,54 ± 0,83	2,78 ± 0,21	2,86 ± 0,32
		Biomassa seca da parte aérea (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	0,85 ± 0,04	0,84 ± 0,01	0,79 ± 0,06	0,83 ± 0,03	0,82 ± 0,06	0,83 ± 0,06
	0,06	0,59 ± 0,01	0,59 ± 0,04	0,58 ± 0,06	0,52 ± 0,05	0,60 ± 0,03	0,62 ± 0,06
	0,15	0,49 ± 0,08	0,45 ± 0,04	0,51 ± 0,06	0,51 ± 0,03	0,48 ± 0,01	0,46 ± 0,07
	0,55	0,49 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,46 ± 0,06	0,44 ± 0,07	0,46 ± 0,02	0,49 ± 0,01
	1,00	0,57 ± 0,09	0,53 ± 0,02	0,49 ± 0,15	0,60 ± 0,12	0,52 ± 0,10	0,50 ± 0,09
	1,23	0,58 ± 0,17	0,61 ± 0,05	0,74 ± 0,18	0,73 ± 0,16	0,56 ± 0,13	0,60 ± 0,09
		Biomassa fresca da raiz (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	4,41 ± 0,45	3,56 ± 0,79	4,22 ± 0,24	4,40 ± 0,27	3,99 ± 0,20	3,79 ± 0,41
	0,06	2,23 ± 0,35	0,93 ± 0,15	1,24 ± 0,09	2,11 ± 0,25	1,98 ± 0,18	2,01 ± 0,30
	0,15	2,32 ± 0,24	2,20 ± 0,18	2,28 ± 0,34	2,42 ± 0,10	2,03 ± 0,20	1,28 ± 0,20
	0,55	2,23 ± 0,42	2,31 ± 0,23	1,86 ± 0,65	1,92 ± 0,08	1,86 ± 0,19	1,56 ± 0,51
	1,00	1,41 ± 0,37	2,13 ± 0,70	1,38 ± 0,91	1,18 ± 0,63	2,43 ± 0,76	2,12 ± 0,39
	1,23	1,34 ± 0,78	1,05 ± 0,40	0,77 ± 0,57	0,89 ± 0,62	1,20 ± 0,53	1,14 ± 0,40
		Biomassa seca da raiz (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	0,27 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,04
	0,06	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,03
	0,15	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,17 ± 0,02
	0,55	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,03
	1,00	0,14 ± 0,02	0,20 ± 0,05	0,14 ± 0,05	0,19 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,19 ± 0,04
	1,23	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,09 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,14 ± 0,05	0,12 ± 0,02

Os bioensaios de fitotoxicidade com *D. lablab* (Figura 16) apresentaram os efeitos de 2,4-D de forma mais evidente em comparação com a espécie *C. ensiformis*. O aumento das concentrações do herbicida promoveu o decréscimo significativo dos comprimentos da parte aérea e da raiz em todas as concentrações testadas (ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, *p*

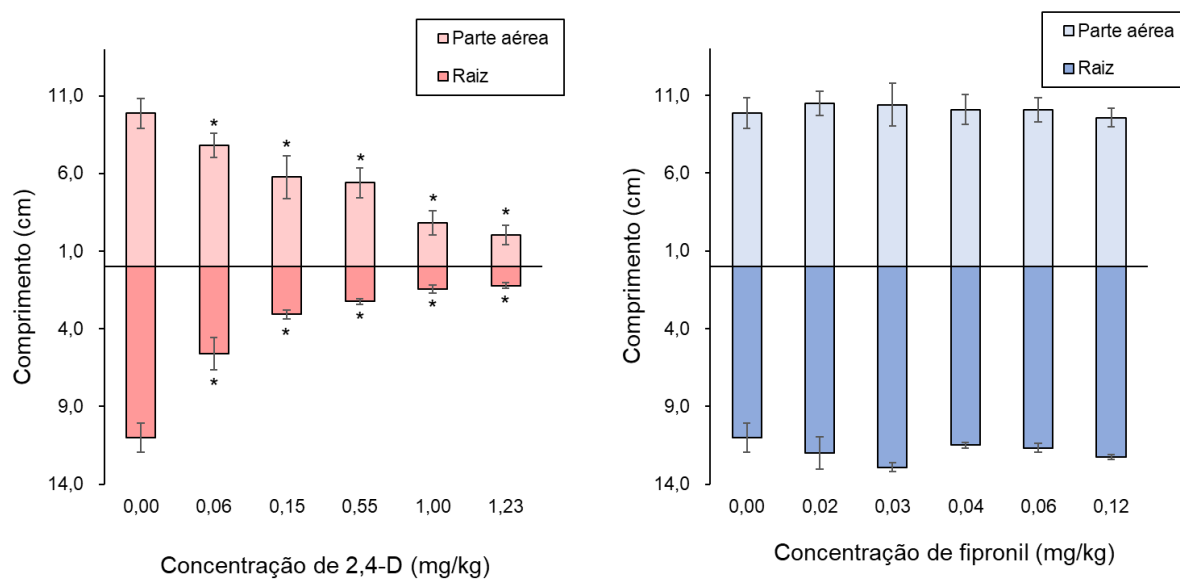
< 0,05). Os efeitos de inibição de crescimento foram maiores para o crescimento da raiz em relação à parte aérea (Figura 17). Da mesma forma que a espécie *C. ensiformis*, não foram identificados efeitos de fitotoxicidade quando as plantas foram expostas a diferentes concentrações de fipronil (até 0,12 mg kg⁻¹, $p > 0,05$).

Figura 16 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas *Dolichos lablab* quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura, com destaque para a disposição dos experimentos (A), visão geral com um pote de cada tratamento (n = 36) (B) e uma planta representativa de cada tratamento com diferentes concentrações de 2,4-D (C).



Nota: C0 corresponde ao controle não contaminado e C1 a C5 correspondem às diferentes concentrações de 2,4-D utilizadas (0,00, 0,06, 0,15, 0,55, 1,00 e 1,23 mg/kg, respectivamente).

Figura 17 – Crescimento inicial da parte aérea e da raiz de plantas *Dolichos lablab* no ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil de forma isolada.



As duas maiores concentrações de 2,4-D (1,00 e 1,23 mg kg⁻¹) registraram redução na porcentagem de germinação, com exceção para 1,00 mg kg⁻¹ de 2,4-D em mistura com 0,059 mg kg⁻¹ de fipronil. Os resultados de comprimento de raiz e parte aérea não foram influenciados pelas diferentes proporções de fipronil em mistura (Tabela 16), sendo o aumento das concentrações de 2,4-D o principal fator para um decréscimo significativo no crescimento desses *endpoints*. Dentro das concentrações testadas, o 2,4-D ocasionou maiores efeitos de inibição de crescimento de biomassa fresca e seca da parte aérea e da raiz em relação ao fipronil dentro das concentrações testadas (Tabela 17).

Tabela 16 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas *Dolichos lablab* expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e tamanho da raiz.

Misturas		Porcentagem de germinação (%)					
		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	90,0 ± 20,0	95,0 ± 10,0	100,0 ± 0,0
	0,06	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	0,15	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	0,55	100,0 ± 0,0	95,0 ± 10,0	100,0 ± 0,0	90,0 ± 11,5	100,0 ± 0,0	85,0 ± 19,1
	1,00	85,0 ± 10,0	70,0 ± 11,5	65,0 ± 10,0	80,0 ± 16,3	100,0 ± 0,0	85,0 ± 10,0
	1,23	60,0 ± 16,3	30,0 ± 20,0	60,0 ± 16,3	60,0 ± 16,3	60,0 ± 28,3	65,0 ± 30,0
Misturas		Comprimento da parte aérea (cm)					
		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	9,9 ± 1,0	10,5 ± 1,0	10,4 ± 0,7	10,1 ± 0,5	10,1 ± 0,4	9,6 ± 0,5
	0,06	7,8 ± 0,8	8,2 ± 1,1	8,0 ± 0,9	8,7 ± 0,7	8,8 ± 0,2	8,3 ± 0,8
	0,15	5,8 ± 1,4	5,9 ± 0,5	6,5 ± 0,6	7,5 ± 0,3	6,2 ± 1,0	6,1 ± 0,8
	0,55	5,4 ± 1,0	5,0 ± 0,3	4,5 ± 1,4	4,3 ± 0,8	5,1 ± 0,8	4,6 ± 0,9
	1,00	2,8 ± 0,8	3,2 ± 0,8	3,4 ± 0,5	2,8 ± 0,6	3,0 ± 0,5	3,8 ± 0,7
	1,23	2,0 ± 0,6	2,5 ± 0,8	2,0 ± 0,5	2,9 ± 0,4	1,9 ± 0,9	2,1 ± 0,6
Misturas		Comprimento da raiz (cm)					
		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	11,0 ± 0,9	12,0 ± 1,1	12,9 ± 1,6	11,5 ± 0,4	11,7 ± 0,7	12,3 ± 2,0
	0,06	5,6 ± 1,0	6,3 ± 0,5	6,2 ± 0,3	6,0 ± 0,4	5,2 ± 0,3	6,3 ± 0,3
	0,15	3,1 ± 0,3	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,1
	0,55	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1
	1,00	1,4 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,2
	1,23	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1

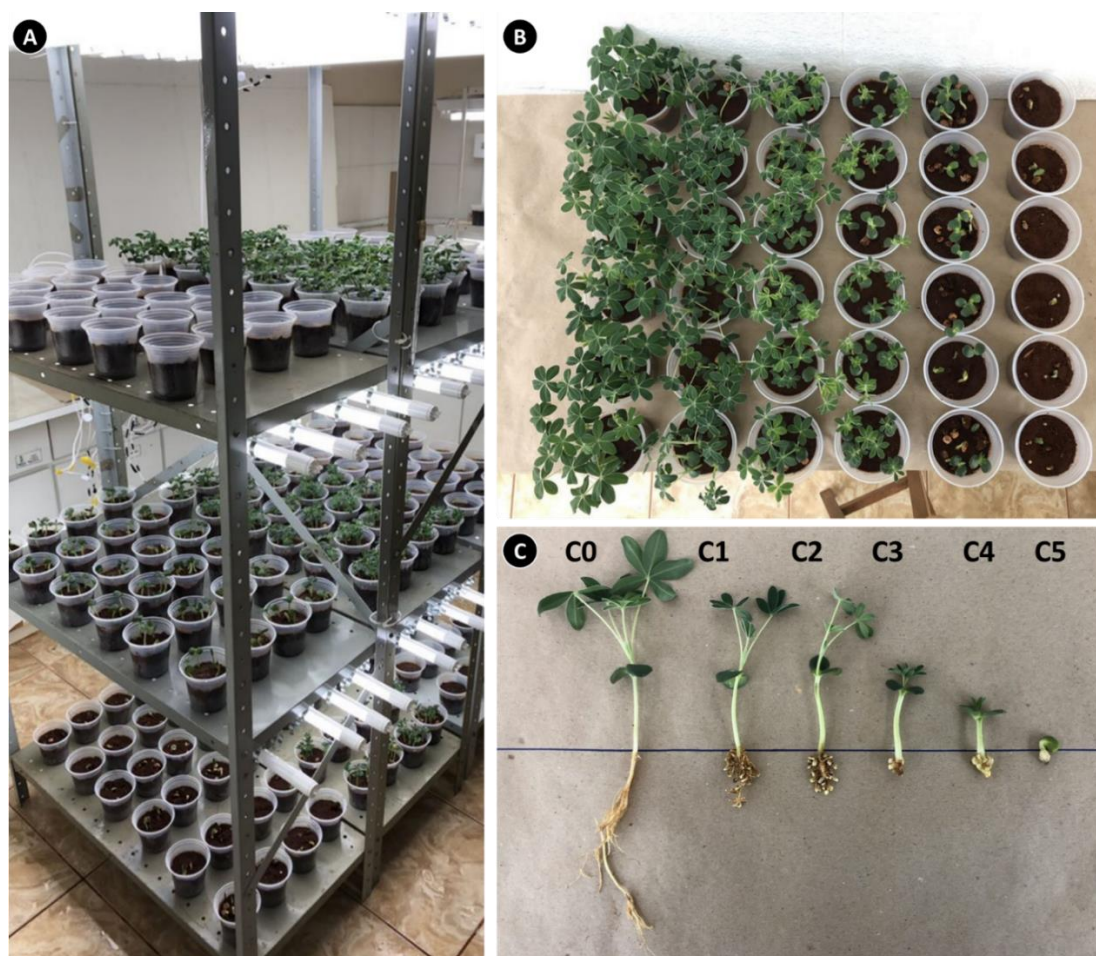
Tabela 17 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas *Dolichos lablab* expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando biomassa fresca e seca da parte aérea e da raiz.

		Biomassa fresca da parte aérea (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	1,88 ± 0,12	1,83 ± 0,16	1,89 ± 0,13	2,12 ± 0,72	1,78 ± 0,41	1,70 ± 0,12
	0,06	1,32 ± 0,13	1,38 ± 0,11	1,47 ± 0,07	1,45 ± 0,20	1,40 ± 0,10	1,52 ± 0,06
	0,15	1,19 ± 0,02	1,32 ± 0,05	1,19 ± 0,10	1,18 ± 0,06	1,31 ± 0,07	1,15 ± 0,06
	0,55	1,05 ± 0,08	1,24 ± 0,18	1,15 ± 0,08	1,32 ± 0,24	1,13 ± 0,06	1,25 ± 0,23
	1,00	0,99 ± 0,07	1,19 ± 0,46	1,35 ± 0,19	1,15 ± 0,52	0,85 ± 0,12	1,09 ± 0,21
	1,23	0,89 ± 0,43	2,21 ± 1,20	1,08 ± 0,43	0,93 ± 0,51	1,21 ± 0,48	0,97 ± 0,56
		Biomassa seca da parte aérea (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,07	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,01
	0,06	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01
	0,15	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
	0,55	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,03
	1,00	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,05	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,01
	1,23	0,18 ± 0,04	0,45 ± 0,22	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,09	0,20 ± 0,07	0,19 ± 0,11
		Biomassa fresca da raiz (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	0,54 ± 0,07	0,56 ± 0,06	0,60 ± 0,07	0,55 ± 0,24	0,51 ± 0,20	0,49 ± 0,10
	0,06	0,86 ± 0,09	0,80 ± 0,04	0,79 ± 0,08	0,72 ± 0,08	0,62 ± 0,04	0,66 ± 0,04
	0,15	0,52 ± 0,09	0,70 ± 0,09	0,80 ± 0,09	0,82 ± 0,17	0,83 ± 0,03	0,69 ± 0,09
	0,55	0,51 ± 0,07	0,63 ± 0,10	0,65 ± 0,06	0,72 ± 0,12	0,67 ± 0,04	0,77 ± 0,19
	1,00	0,67 ± 0,12	0,72 ± 0,30	0,66 ± 0,13	0,63 ± 0,20	0,50 ± 0,05	0,64 ± 0,18
	1,23	0,52 ± 0,32	1,01 ± 0,49	0,53 ± 0,46	0,51 ± 0,24	0,73 ± 0,24	0,61 ± 0,35
		Biomassa seca da raiz (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	0,06	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	0,15	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,01
	0,55	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02
	1,00	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,02
	1,23	0,07 ± 0,02	0,16 ± 0,08	0,08 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,02

Os bioensaios com *L. albus* foram apresentados na Figura 18. Para todas as concentrações de fipronil isoladamente, o crescimento das plantas *L. albus* foi similar ao controle (ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, $p > 0,05$) e não foram observados efeitos de fitotoxicidade (Figura 19). Porém, o aumento da concentração 2,4-D inibiu o crescimento da

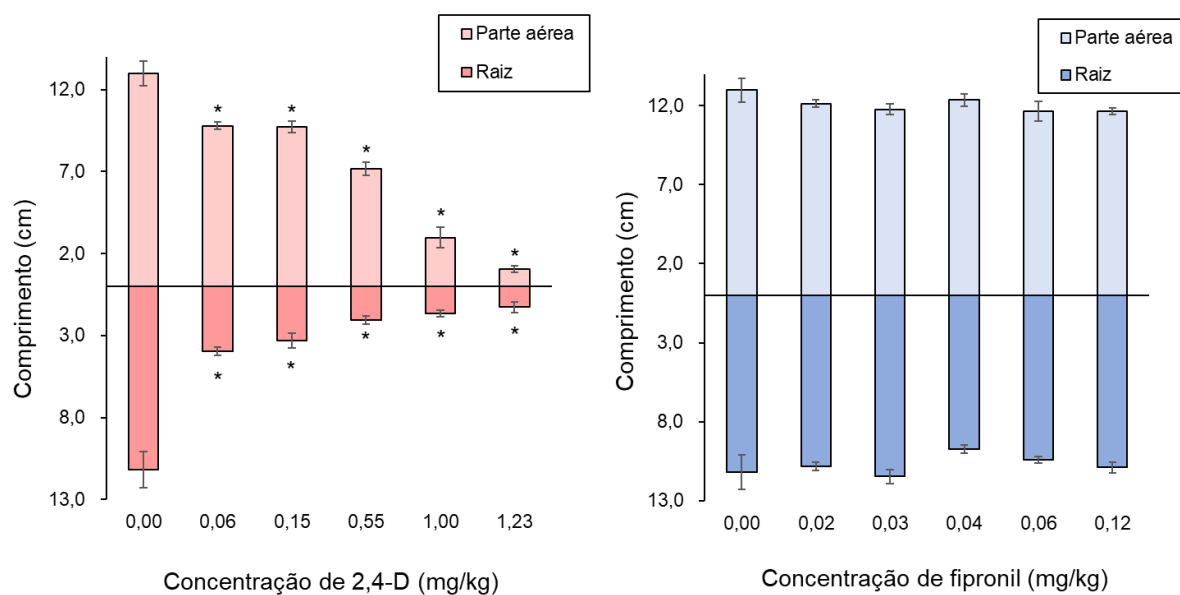
parte aérea, da raiz e da biomassa fresca. Nesse contexto, foi observado que as raízes apresentaram maior sensibilidade ao herbicida em comparação com os outros *endpoints*, conforme observado para *D. lablab*. Todas as concentrações de 2,4-D testadas, de forma isolada, resultaram no significativo decréscimo do comprimento da parte aérea e da raiz das plantas expostas ($p < 0,05$). Mesmo na menor concentração testada ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$), a inibição na raiz foi de 64,7%, enquanto a inibição da parte aérea foi de 24,5%. Na maior dosagem ($1,26 \text{ mg kg}^{-1}$), a inibição da parte aérea e da raiz foi de 91,8 e 88,7%, respectivamente.

Figura 18 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas *Lupinus albus* quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura, com destaque para a disposição dos experimentos (A), visão geral com um pote de cada tratamento ($n = 36$) (B) e uma planta representativa de cada tratamento com diferentes concentrações de 2,4-D (C).



Nota: C0 corresponde ao controle não contaminado e C1 a C5 correspondem às diferentes concentrações de 2,4-D utilizadas ($0,00$, $0,06$, $0,15$, $0,55$, $1,00$ e $1,23 \text{ mg/kg}$, respectivamente).

Figura 19 – Crescimento inicial da parte aérea e da raiz de plantas *Lupinus albus* no ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D e fipronil de forma isolada.



Ao contrário das outras duas espécies, *L. albus* não apresentou diferenças significativas para a germinação das sementes ($p > 0,05$), que apresentaram valores iguais ou próximos a 100% em todos os tratamentos (Tabela 18). A biomassa fresca total teve inibição de 20,1% na menor concentração testada (0,05 mg kg⁻¹) em relação ao controle não contaminado. Na maior dosagem (1,26 mg kg⁻¹), a biomassa fresca total foi inibida em 42,1% (Tabela 19).

Tabela 18 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas *Lupinus albus* expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e tamanho da raiz.

Misturas		Porcentagem de germinação (%)					
		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	0,06	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	0,15	95 ± 10	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	0,55	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	95 ± 10	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	1,00	100,0 ± 0,0	90,0 ± 11,5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	1,23	100,0 ± 0,0	90,0 ± 11,5	100,0 ± 0,0	90,0 ± 11,5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
Misturas		Comprimento da parte aérea (cm)					
		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	13,0 ± 0,8	12,1 ± 1,1	11,8 ± 0,6	12,4 ± 0,2	11,7 ± 1,8	11,7 ± 0,5
	0,06	9,8 ± 0,2	10,1 ± 0,5	10,0 ± 0,2	10,3 ± 0,7	9,9 ± 0,5	10,1 ± 1,0
	0,15	9,7 ± 0,3	9,6 ± 0,8	9,3 ± 0,4	9,6 ± 0,4	9,2 ± 0,6	9,5 ± 0,4
	0,55	7,2 ± 0,4	6,6 ± 0,5	6,4 ± 0,4	6,5 ± 0,6	6,7 ± 0,7	5,9 ± 0,7
	1,00	3,0 ± 0,6	3,3 ± 0,9	3,3 ± 0,2	3,9 ± 0,5	3,0 ± 0,7	3,8 ± 0,8
	1,23	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,5	1,2 ± 0,2
Misturas		Comprimento da raiz (cm)					
		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	11,2 ± 1,1	10,8 ± 1,8	11,5 ± 1,2	9,8 ± 1,1	10,4 ± 1,3	10,9 ± 0,6
	0,06	4,0 ± 0,3	4,3 ± 0,5	4,5 ± 0,6	4,6 ± 0,3	4,2 ± 0,1	4,0 ± 0,2
	0,15	3,3 ± 0,4	2,8 ± 0,3	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,1
	0,55	2,1 ± 0,3	1,8 ± 0,3	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,3	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,1
	1,00	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,3
	1,23	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,1

Tabela 19 – Ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial de plantas *Lupinus albus* expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36), considerando biomassa fresca e seca da parte aérea e da raiz.

		Biomassa fresca da parte aérea (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	1,88 ± 0,12	1,83 ± 0,16	1,89 ± 0,13	1,80 ± 0,08	1,67 ± 0,30	1,70 ± 0,12
	0,06	1,32 ± 0,13	1,38 ± 0,11	1,47 ± 0,07	1,45 ± 0,20	1,40 ± 0,10	1,52 ± 0,06
	0,15	1,26 ± 0,16	1,32 ± 0,05	1,19 ± 0,10	1,18 ± 0,06	1,31 ± 0,07	1,15 ± 0,06
	0,55	1,05 ± 0,08	1,16 ± 0,10	1,21 ± 0,06	1,17 ± 0,10	1,13 ± 0,06	1,03 ± 0,06
	1,00	0,84 ± 0,11	0,88 ± 0,18	0,86 ± 0,06	0,86 ± 0,25	0,85 ± 0,12	0,92 ± 0,12
	1,23	0,49 ± 0,10	0,54 ± 0,11	0,60 ± 0,07	0,55 ± 0,11	0,63 ± 0,06	0,53 ± 0,13
		Biomassa seca da parte aérea (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,01
	0,06	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01
	0,15	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
	0,55	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,00
	1,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,00
	1,23	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,03
		Biomassa fresca da raiz (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	0,54 ± 0,07	0,56 ± 0,06	0,60 ± 0,07	0,46 ± 0,09	0,48 ± 0,18	0,49 ± 0,10
	0,06	0,86 ± 0,09	0,80 ± 0,04	0,79 ± 0,08	0,72 ± 0,08	0,62 ± 0,04	0,66 ± 0,04
	0,15	0,55 ± 0,11	0,70 ± 0,09	0,80 ± 0,09	0,82 ± 0,17	0,83 ± 0,03	0,69 ± 0,09
	0,55	0,51 ± 0,07	0,60 ± 0,09	0,68 ± 0,01	0,65 ± 0,11	0,67 ± 0,04	0,63 ± 0,02
	1,00	0,56 ± 0,07	0,53 ± 0,14	0,42 ± 0,05	0,49 ± 0,11	0,50 ± 0,05	0,54 ± 0,15
	1,23	0,28 ± 0,11	0,27 ± 0,06	0,27 ± 0,15	0,34 ± 0,19	0,39 ± 0,05	0,34 ± 0,13
		Biomassa seca da raiz (g)					
Misturas		Fipronil (mg kg ⁻¹)					
		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
2,4-D (mg kg ⁻¹)	0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	0,06	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	0,15	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,01
	0,55	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	1,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
	1,23	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01

Para as três espécies em diferentes misturas, os dados foram estatisticamente diferentes para todos os *endpoints* ($p < 0,05$). Quando as combinações de misturas de agrotóxicos foram avaliadas para uma mesma concentração de fipronil, não foram observadas diferenças para crescimento da parte aérea e para desenvolvimento de biomassa fresca de *L. albus*. Para raiz,

o *post hoc* de Tukey identificou diferenças estatísticas nas amostras sem 2,4-D apenas para 0,26 mg kg⁻¹ de fipronil em comparação com as outras dosagens do inseticida. Assim, não foi possível identificar potencialização dos efeitos tóxicos dos agrotóxicos em mistura.

Como as espécies testadas apresentam tamanhos diferenciados, a comparação das espécies foi feita por normalização das porcentagens de efeito em relação ao controle não-contaminado de cada espécie (Figura 20). Na maior concentração de 2,4-D (1,26 mg kg⁻¹), *D. lablab* foi a espécie que apresentou menor inibição do crescimento de parte aérea (entre 70,9 e 81,0% para todas as concentrações de fipronil testadas). Por outro lado, nessa mesma concentração, todas as espécies apresentaram porcentagens de inibição do crescimento das raízes semelhantes. Porém, para a segunda maior dosagem (1,00 mg kg⁻¹), *C. ensiformis* apresentou menor sensibilidade ao herbicida 2,4-D (inibição de crescimento do sistema radicular entre 37,4 e 58,8% para as diferentes concentrações de fipronil testadas).

Figura 20 – Porcentagem de inibição (%) de crescimento da parte aérea e da raiz de plantas *Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab* e *Lupinus albus* no ensaio de fitotoxicidade para avaliação do crescimento inicial quando expostas a 2,4-D e fipronil em diferentes proporções de mistura (n = 36).

<i>Canavalia ensiformis</i>	PARTE AÉREA		Fipronil (mg/kg)					
	Misturas		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
	2,4-D (mg/kg)							
	0,00	0	6,7	13,8	11,7	11,9	7,9	
	0,06	31,8	30,7	28,7	27,3	29,6	30,8	
	0,15	35,1	40,3	35,9	33,7	33,4	40,4	
	0,55	39,8	38,7	37,5	38,9	41,3	47,5	
	1,00	76,1	59,2	67,9	74,4	61,6	61,9	
	1,23	90,8	90,1	93,4	90,8	87,0	88,0	

<i>Canavalia ensiformis</i>	RAIZ		Fipronil (mg/kg)					
	Misturas		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
	2,4-D (mg/kg)							
	0,00	0	-11,7	0,5	11,0	10,3	14,3	
	0,06	21,5	11,8	19,0	17,7	19,6	22,3	
	0,15	15,3	11,3	13,2	25,1	28,3	20,7	
	0,55	7,6	13,8	10,4	13,8	5,9	20,4	
	1,00	58,8	37,4	56,4	51,9	45,4	54,1	
	1,23	88,5	84,2	90,6	90,6	82,4	80,8	

<i>Dolichos lablab</i>	PARTE AÉREA		Fipronil (mg/kg)					
	Misturas		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
	2,4-D (mg/kg)							
	0,00	0	-6,3	-5,2	-2,3	-1,9	3,1	
	0,06	21,1	17,0	18,8	12,0	10,9	15,6	
	0,15	41,6	40,7	34,5	24,5	37,1	37,9	
	0,55	45,3	48,9	54,3	56,6	48,3	53,6	
	1,00	71,4	68,0	65,7	72,1	70,0	61,8	
	1,23	79,4	75,0	79,9	70,9	81,0	79,2	

<i>Dolichos lablab</i>	RAIZ		Fipronil (mg/kg)					
	Misturas		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
	2,4-D (mg/kg)							
	0,00	0	-9,0	-17,4	-4,4	-5,9	-11,4	
	0,06	49,2	42,4	43,3	45,4	52,4	42,6	
	0,15	72,1	78,1	78,2	77,3	77,9	79,0	
	0,55	79,6	82,9	83,1	84,0	80,7	83,6	
	1,00	86,9	84,2	83,6	85,7	85,7	86,2	
	1,23	88,9	88,4	87,0	86,5	90,6	89,5	

<i>Lupinus albus</i>	PARTE AÉREA		Fipronil (mg/kg)					
	Misturas		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
	2,4-D (mg/kg)							
	0,00	0	6,6	9,4	4,9	10,2	10,2	
	0,06	24,5	22,1	23,2	20,6	23,9	22,5	
	0,15	25,2	26,4	28,3	26,1	29,5	27,1	
	0,55	44,9	49,0	50,9	49,9	48,4	54,8	
	1,00	77,1	74,9	74,3	69,7	77,2	70,7	
	1,23	91,8	90,5	89,7	90,4	87,1	90,6	

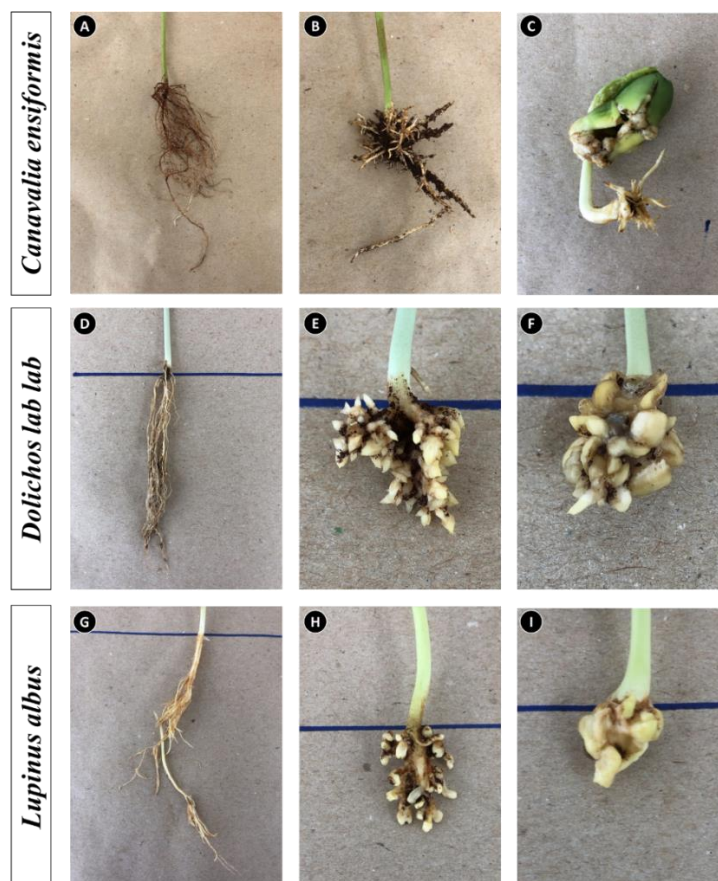
<i>Lupinus albus</i>	RAIZ		Fipronil (mg/kg)					
	Misturas		0,000	0,016	0,031	0,037	0,059	0,120
	2,4-D (mg/kg)							
	0,00	0	3,1	-2,6	12,8	6,8	2,6	
	0,06	64,7	61,4	60,2	59,2	62,4	64,3	
	0,15	70,4	75,1	75,2	75,2	76,2	76,5	
	0,55	81,7	83,7	81,4	82,4	82,9	82,4	
	1,00	85,1	84,8	87,0	84,9	86,2	86,2	
	1,23	88,7	89,9	89,2	90,5	88,1	88,6	

Menor inibição	Maior inibição
----------------	----------------

Aspectos de fitotoxicidade foram identificados em todas as espécies para as diferentes concentrações de 2,4-D testadas (Figura 21). Em especial, além da redução do comprimento

das raízes, destacou-se o inchaço causado pelo crescimento irregular provocado pelo herbicida. Esses efeitos subletais foram observados principalmente para as espécies *D. lablab* e *L. albus*, indicando maior resistência da espécie *C. ensiformis*. As alterações no crescimento e desenvolvimento das raízes impedem que a planta consiga absorver água e nutrientes de forma adequada, o que pode levar à morte. O amarelamento das folhas não foi observado para nenhuma planta exposta, apesar de esse ter sido um sintoma de fitotoxicidade reportado em outro estudo com *Plectranthus neochilus* em concentrações acima de 14,28 kg ha⁻¹ (RAMBORGER et al., 2017). Esse estudo também indicou o potencial do 2,4-D de reduzir o tamanho das raízes e promover inchaço, que foi atribuído às alterações de crescimento ocasionadas pelo efeito auxínico do herbicida.

Figura 21 – Destaque para as diferenças entre as raízes das plantas *Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab* e *Lupinus albus* presentes nos tratamentos sem contaminação (A, D e G) em comparação com as concentrações de 2,4-D intermediárias (B, E e H) e máximas (C, F e I) testadas.



Esses resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que os efeitos do 2,4-D na fitotoxicidade de plantas já foram relatados. Em um estudo anterior (OGURA et al., 2022a), amostras de água coletadas em mesocosmos contaminados (447 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D e 63,49 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil) foram utilizadas para a irrigação da espécie leguminosa *Phaseolus vulgaris* L. e promoveram maior inibição da parte aérea e das raízes na presença do 2,4-D (17 e 45%, respectivamente) em relação ao fipronil (3 e 8%, respectivamente). Nesse estudo, não foram detectados efeitos de sinergismo entre os dois agrotóxicos estudados quando aplicados em mistura. O 2,4-D também influenciou o crescimento inicial da espécie *Z. mays* L. (até 17% de inibição radicular), uma planta monocotiledônea não-alvo.

Cenkci et al. (2010) estabeleceram que a inibição do crescimento radicular foi mais evidente do que a inibição da parte aérea para *P. vulgaris* L., mesmo em baixas concentrações (0,1 a 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$). Essa condição também foi observada na presente pesquisa para as espécies *D. lablab* e *L. albus* expostas ao herbicida; porém, *C. ensiformis* apresentou maior sensibilidade para o crescimento de parte aérea quando exposta ao 2,4-D. Em um estudo com a espécie *Trifolium pratense* (i.e., trevo-vermelho), a fitotoxicidade do 2,4-D foi mais evidente para a biomassa da parte aérea em relação com a biomassa da raiz (TAYLOR et al., 1989). Além disso, esses autores indicaram que a fitotoxicidade do 2,4-D foi significativamente maior (cerca de 22 a 24 vezes) quando comparado com o metabólito de sua degradação, o 2,4-diclorofenol.

Mesmo na ausência de inibição do crescimento, efeitos subletais podem ser decorrentes da exposição das plantas terrestres a agrotóxicos. Por exemplo, o fipronil causou efeitos de genotoxicidade na monocotiledônea *Allium cepa*, com alteração do micronúcleo e aberrações cromossômicas em concentrações acima de 2,5 mg L^{-1} (KARAISSMAILIOGLU, 2017). Entretanto, o 2,4-D ainda apresentou maior potencial para causar efeitos citogenéticos em *A. cepa*, como observado por Özkul et al. (2016) em diferentes concentrações de 2,4-D (0,67 a 4,02 mg L^{-1}), incluindo interferências na mitose C, viscosidade, retardamentos, pontes,

fragmentos e multipolaridade. Em outro estudo, Ateeq et al. (2002) avaliaram a genotoxicidade em plantas *A. cepa* expostas ao 2,4-D (entre 5 e 20 mg L⁻¹), indicando ocorrência de alterações morfológicas, aberrações cromossômicas e raízes quebradas.

O 2,4-D pode impactar outros cultivos agrícolas e espécies arbóreas, tanto pelas concentrações residuais no solo quanto pela dispersão no ambiente. A espécie de café *Coffea arabica* L. apresentou sintomas de fitotoxicidade em tratamentos com 10, 25 e 50% da dosagem recomendada de 2,4-D (2,5 L ha⁻¹), como hiponastia, clorose, murchamento e anomalias foliares (VOLTOLINI et al., 2019). Costa et al. (2022b) avaliaram a fitotoxicidade na espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi (i.e., aroeira) quando exposta ao 2,4-D (8 porcentagens da dosagem recomendada de 835,7 g ha⁻¹). Os autores identificaram que os efeitos causados pelo 2,4-D foram menores quando comparados com o herbicida dicamba. No estudo de Costa et al. (2022a), a espécie *Crotalaria juncea* foi avaliada quando exposta a uma solução de 2,4-D (0, 0,2, 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) por 30 dias. A fitotoxicidade no comprimento das raízes foi mais evidente em relação aos demais parâmetros avaliados (i.e., peso seco, número de folhas e comprimento da parte aérea). Assim como observado na presente pesquisa, esses autores também identificaram sintomas de fitotoxicidade, especialmente deformações nas raízes.

A fitotoxicidade para a espécie *Triticum aestivum* L. (i.e., trigo) apresentou antagonismo quando o 2,4-D foi aplicado em mistura com o herbicida glifosato; a forma de aplicação do 2,4-D interferiu na redução da fitotoxicidade do glifosato, uma vez que houve maior potencial efeito antagônico para as formulações com sal de dimetilamina, éster de butoxietil e sal de sódio (NALEWAJA e MATYSIAK, 1992). Esses resultados podem justificar a ausência de fitotoxicidade do 2,4-D ao milheto (*Pennisetum americanum*), observada no estudo de Pacheco et al. (2007). Nesse estudo, o solo foi preparado para a semeadura do milheto por dessecação utilizando o herbicida glifosato (1.800 g ha⁻¹) e, mesmo

com três dosagens de 2,4-D testadas (335, 670 e 1.005 g ha⁻¹), não houve interferência, de forma significativa, na produção de grãos dessa espécie, o que foi atribuído à possível detoxificação das plantas expostas ao herbicida. Além disso, os autores consideraram quatro períodos de aplicação (10, 20, 30 e 40 dias após a emergência), o que pode indicar que os efeitos de fitotoxicidade do 2,4-D podem ser mais atuantes durante o período de germinação e emergência das plântulas.

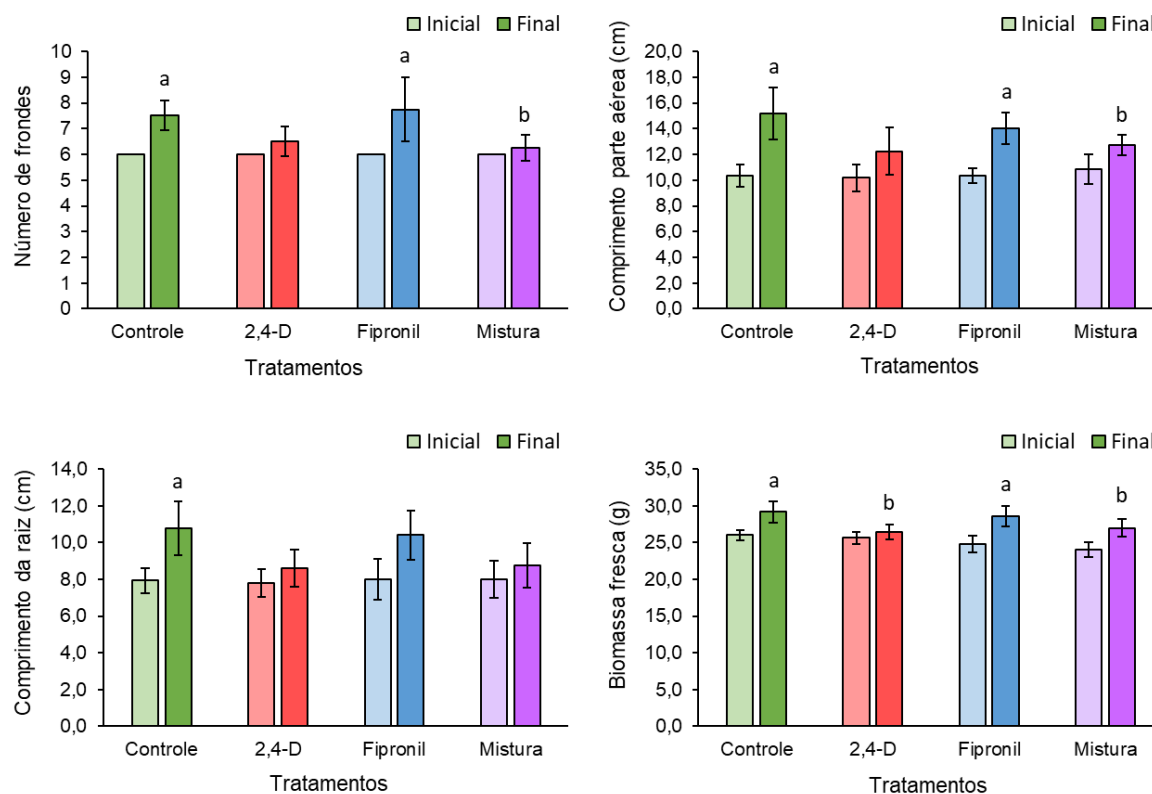
Dessa forma, a sub-hipótese 1 da presente pesquisa foi parcialmente aceita para as plantas terrestres, uma vez que a fitotoxicidade foi maior quando as plantas foram expostas ao 2,4-D em relação ao fipronil. Porém, os efeitos de fitotoxicidade não foram mais significativos quando os agrotóxicos estiveram em mistura, de modo que não foi possível identificar o sinergismo ou antagonismo com a interação entre 2,4-D e fipronil. Porém, mesmo que o fipronil não tenha apresentado toxicidade para as plantas terrestres avaliadas, esse inseticida pode afetar espécies de microrganismos ou invertebrados que auxiliam na ciclagem de nutrientes do solo. Da mesma forma, a presença do herbicida 2,4-D pode inibir o crescimento de outras espécies vegetais não-alvo em solos de cultivo de cana-de-açúcar e prejudicar processos de adubação verde. Assim, estratégias de recuperação dos solos devem ser desenvolvidas para o manejo adequado e a redução dos riscos dos agrotóxicos. O potencial dessas espécies de plantas terrestres pode ser avaliado para fitorremediação de áreas contaminadas por agrotóxicos.

6.3. Fitotoxicidade dos agrotóxicos em plantas aquáticas

A avaliação da fitotoxicidade do 2,4-D, do fipronil e da mistura dos agrotóxicos foi feita para apenas uma concentração (512 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D e 128 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil), sendo que a mistura foi estabelecida na proporção 1:1. Nesta seção, a quantificação química dos agrotóxicos foi feita apenas para as soluções-estoque. Os resultados de detecção dos agrotóxicos corresponderam a 435,3 mg L^{-1} de 2,4-D na solução com concentração nominal de 500 mg L^{-1} e a solução com concentração nominal de 2,0 mg L^{-1} foi quantificada com 1,79 mg L^{-1} . Dessa forma, as concentrações utilizadas foram corrigidas pelo fator 0,87 e 0,89, respectivamente (445,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D e 113,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil).

O ensaio de fitotoxicidade com *E. crassipes* indicou que houve aumento significativo de número de frondes e da parte aérea apenas para o controle e fipronil (ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 22). Apesar das plantas expostas ao 2,4-D não apresentarem aumento significativo do número de frondes e do comprimento da parte aérea, essa diferença ocorreu na mistura ($p > 0,05$). Porém, como não houve diferenças entre o 2,4-D e a mistura, não foi possível identificar uma potencialização dos efeitos por sinergismo. Apenas no controle as plantas tiveram aumento do comprimento da raiz após 7 dias, apesar de todos os tratamentos terem sido considerado semelhantes entre si ($p > 0,05$). Houve aumento de biomassa fresca no controle e no fipronil, mas inibição de crescimento foi detectada no 2,4-D e mistura, que apresentaram diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$).

Figura 22 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Eichhornia crassipes* exposta ao 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.



Notas:

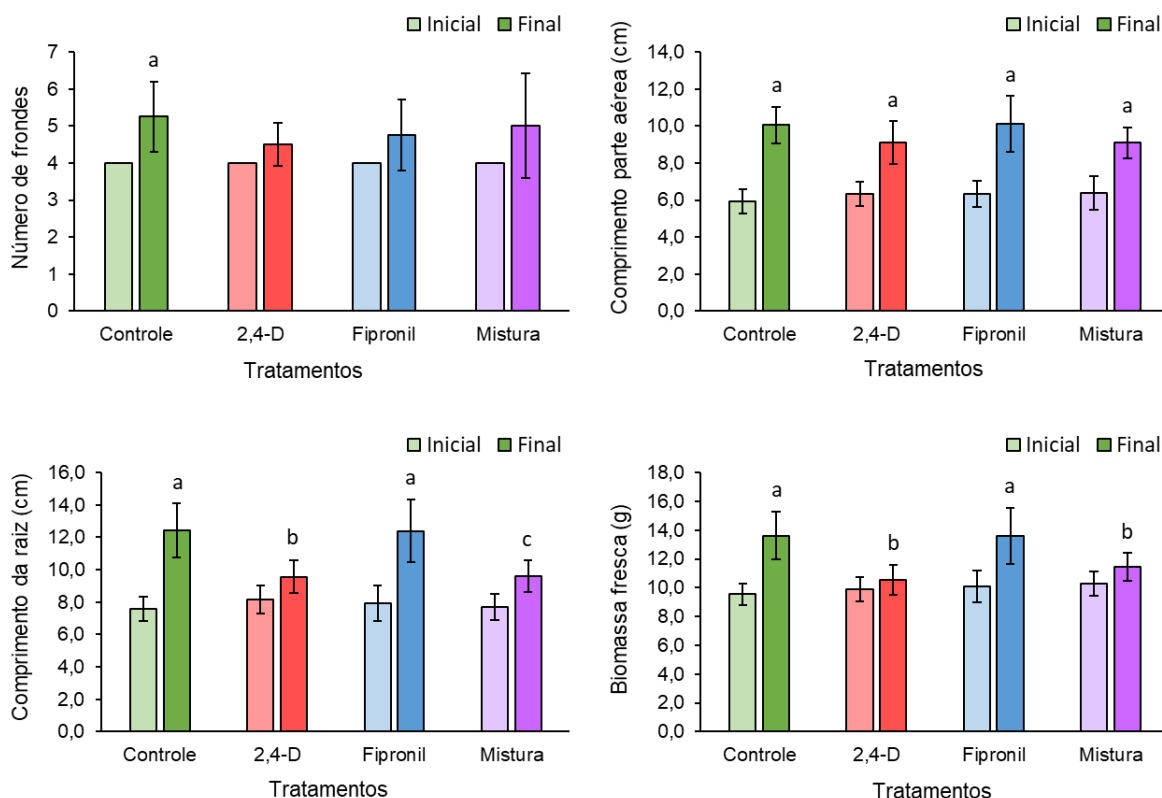
Diferenças estatísticas conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey (considerando $p < 0,05$).

a = diferenças estatísticas significativas em relação ao valor inicial para o mesmo tratamento

b = diferenças estatísticas significativas em relação ao controle não contaminado

O número de frondes de *P. stratiotes* aumentou de forma significativa apenas no controle (ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 23). Porém, os demais tratamentos não apresentaram diferenças entre as respectivas condições iniciais e em relação ao controle ($p > 0,05$), o que pode ser justificado pelo grande desvio padrão observado. Houve aumento do comprimento da parte aérea para todos os tratamentos, que foram semelhantes entre si ($p > 0,05$). Para o comprimento da raiz e biomassa fresca, ocorreu aumento apenas no controle e no fipronil ($p > 0,05$). As plantas apresentaram redução significativa do crescimento de raiz e biomassa fresca quando expostas ao 2,4-D e à mistura ($p < 0,05$). Mesmo assim, as raízes das plantas expostas à mistura tiveram crescimento em relação às condições iniciais.

Figura 23 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Pistia stratiotes* exposta ao 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.



Notas:

Diferenças estatísticas conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey (considerando $p < 0,05$).

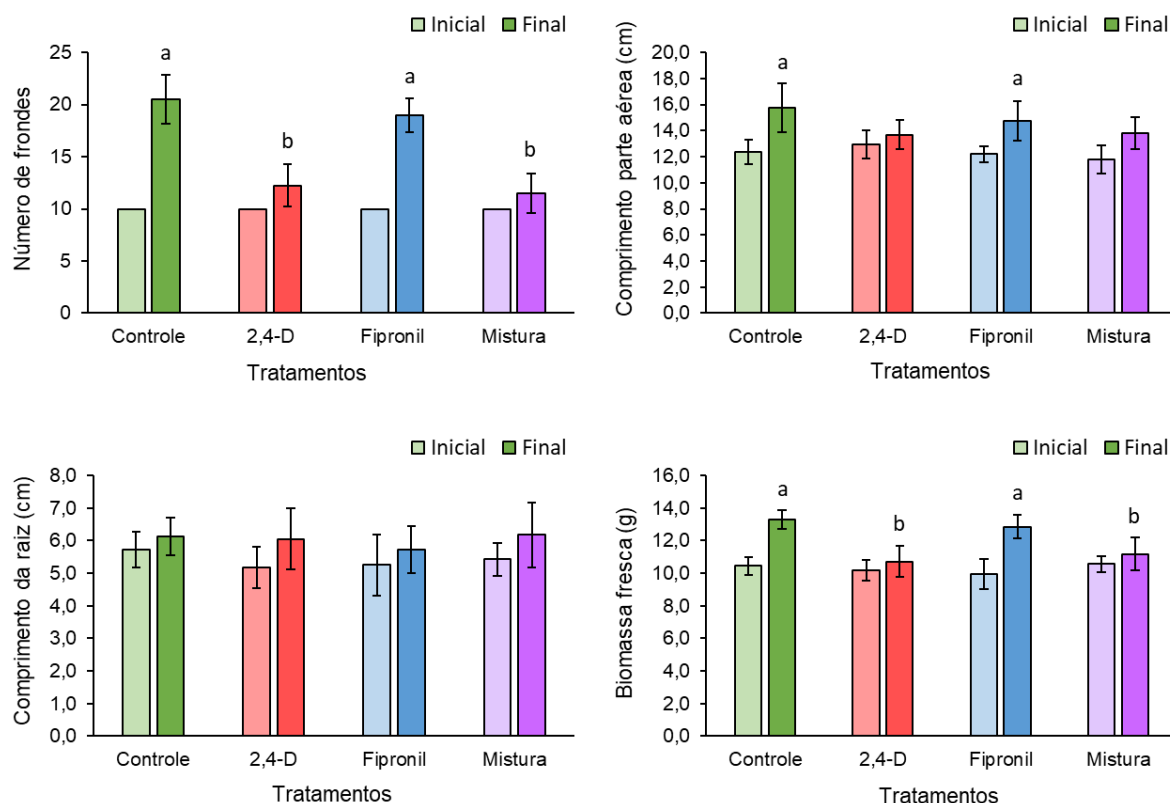
a = diferenças estatísticas significativas em relação ao valor inicial para o mesmo tratamento

b = diferenças estatísticas significativas em relação ao controle não contaminado

c = diferenças estatísticas significativas tanto em relação ao controle não contaminado quanto ao valor inicial

Pelo ensaio com *S. auriculata*, foi possível observar crescimento significativo no número de frondes e na biomassa fresca no controle e fipronil (ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 24). Tanto o 2,4-D quanto a mistura apresentaram redução do número de frondes e biomassa fresca em comparação com o controle. O comprimento da parte aérea só teve aumento significativo no controle e no fipronil, mas o 2,4-D e a mistura não promoveram diferenças em relação ao controle. Não houve diferenças para o comprimento da raiz entre os tratamentos e entre as condições iniciais e finais.

Figura 24 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Salvinia auriculata* exposta ao 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.



Notas:

Diferenças estatísticas conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey (considerando $p < 0,05$).

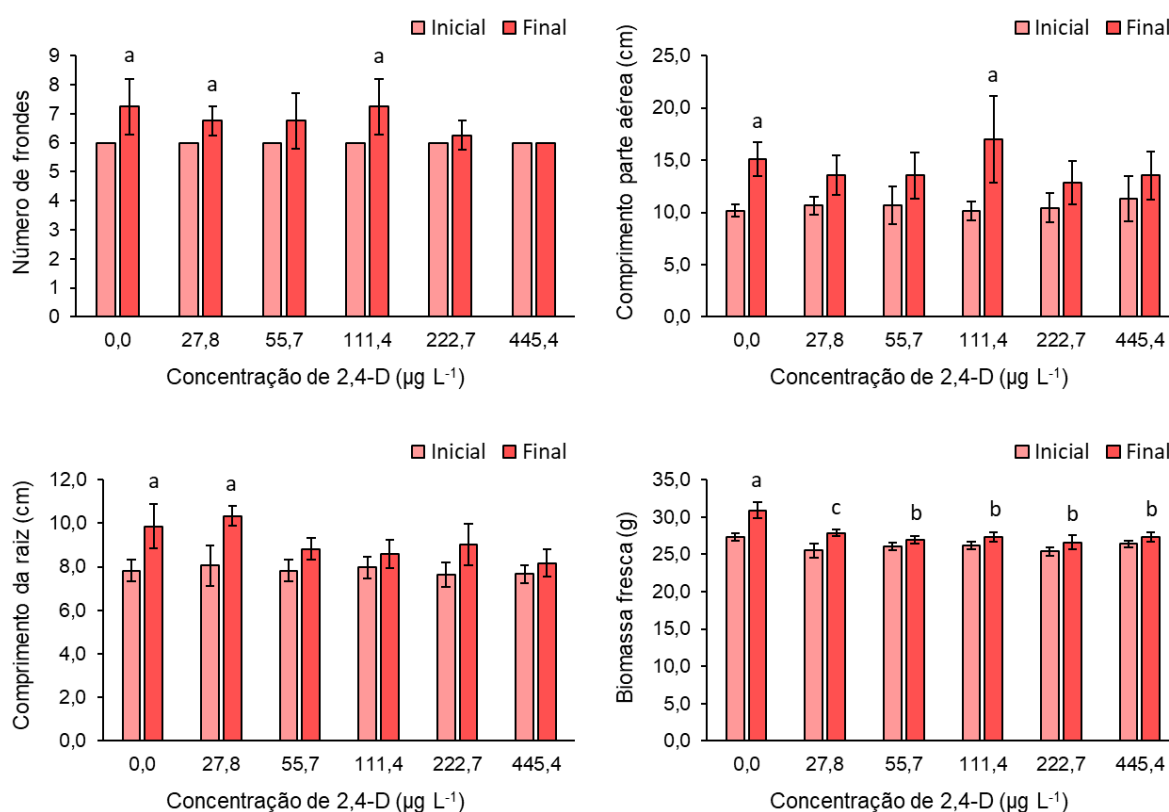
a = diferenças estatísticas significativas em relação ao valor inicial para o mesmo tratamento

b = diferenças estatísticas significativas em relação ao controle não contaminado

Como o 2,4-D foi o agrotóxico que causou os efeitos de toxicidade às plantas aquáticas testadas, cinco concentrações foram testadas de forma isolada, equivalentes a 27,8; 55,7; 111,4; 222,7 e 445,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, conforme quantificação da solução-estoque. Para o ensaio de fitotoxicidade com *E. crassipes* exposta a diferentes concentrações de 2,4-D (Figura 25), após o período de exposição, ocorreu aumento significativo (ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$) no número de frondes dos organismos presentes no controle e em 27,8 e 111,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Entretanto, os valores estiveram próximos (entre 6 e 8) para todos os tratamentos. Apenas o controle e a concentração 111,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentaram crescimento significativo da parte aérea ($p < 0,05$). O tamanho da raiz teve aumento significativo apenas no controle e na concentração 27,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($p < 0,05$). Porém, apenas para o *endpoint* da biomassa fresca apresentou diferenças

estatísticas entre todos os tratamentos de 55,7 a 445,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle ($p < 0,05$). Nesse caso, ocorreu crescimento das plantas aquáticas expostas ao 2,4-D abaixo do esperado para a biomassa fresca (em relação ao controle). Apesar das plantas terem sido padronizadas ao início do teste, destaca-se a variância dos resultados (desvio padrão em relação ao valor médio), em especial para a espécie *E. crassipes*.

Figura 25 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Eichhornia crassipes* exposta a diferentes concentrações de 2,4-D.



Notas:

Diferenças estatísticas conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey (considerando $p < 0,05$).

a = diferenças estatísticas significativas em relação ao valor inicial para o mesmo tratamento

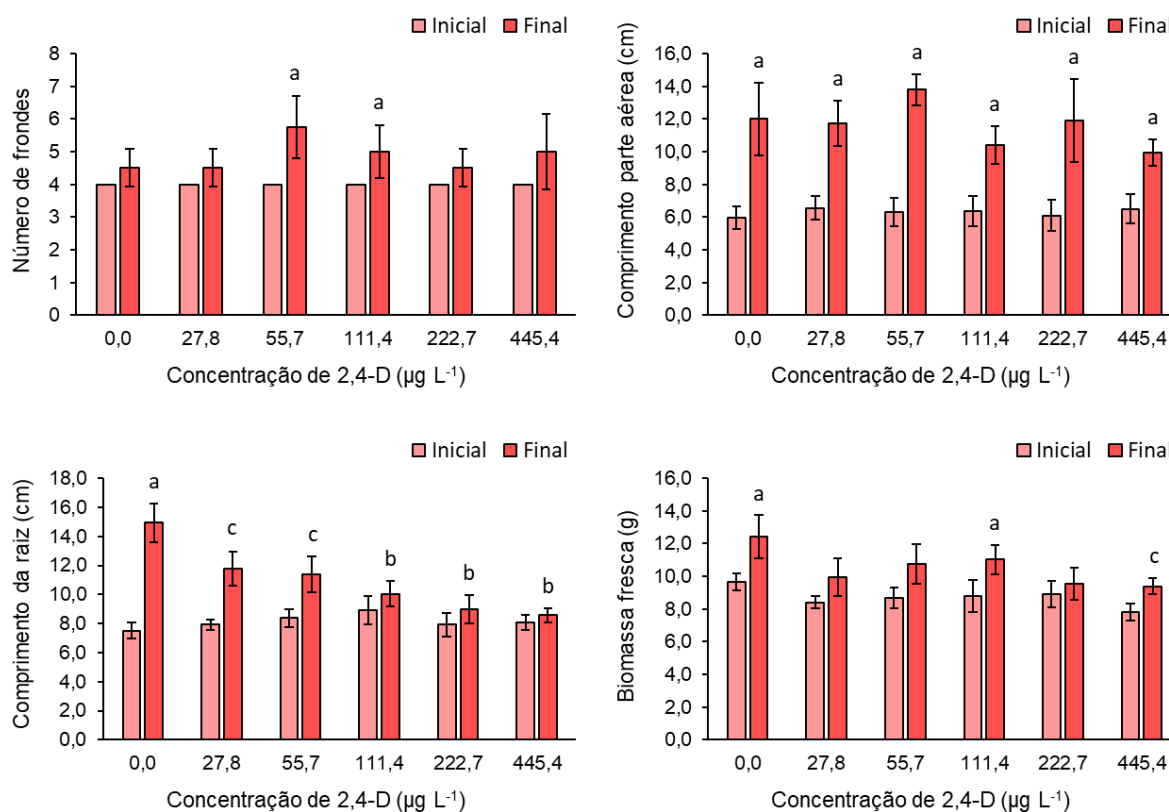
b = diferenças estatísticas significativas em relação ao controle não contaminado

c = diferenças estatísticas significativas tanto em relação ao controle não contaminado quanto ao valor inicial

Para o ensaio de fitotoxicidade com *P. stratiotes* exposta a diferentes concentrações de 2,4-D (Figura 26), após sete dias, apenas as concentrações 55,7 e 111,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentaram aumento significativo do número de frondes (ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$).

Apesar de ter ocorrido aumento do tamanho médio da parte aérea em todos os tratamentos avaliados ($p < 0,05$), não foram identificadas diferenças entre as concentrações de 2,4-D e o controle ($p > 0,05$). Todos os comprimentos de raiz foram significativamente menores com o aumento das concentrações de 2,4-D, indicando que esse foi um *endpoint* afetado durante o desenvolvimento de *P. stratiotes* quando exposta ao herbicida. Em relação às condições iniciais, apenas o controle e as duas primeiras concentrações (27,8 e 55,7 $\mu\text{g L}^{-1}$) apresentaram crescimento significativo do tamanho da raiz após o período de exposição ($p < 0,05$). Ocorreu aumento da biomassa fresca no controle e nas concentrações 111,4 e 445,4 $\mu\text{g L}^{-1}$; porém, apenas a maior concentração apresentou crescimento reduzido em relação ao controle ($p < 0,05$).

Figura 26 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Pistia stratiotes* exposta a diferentes concentrações de 2,4-D.



Notas:

Diferenças estatísticas conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey (considerando $p < 0,05$).

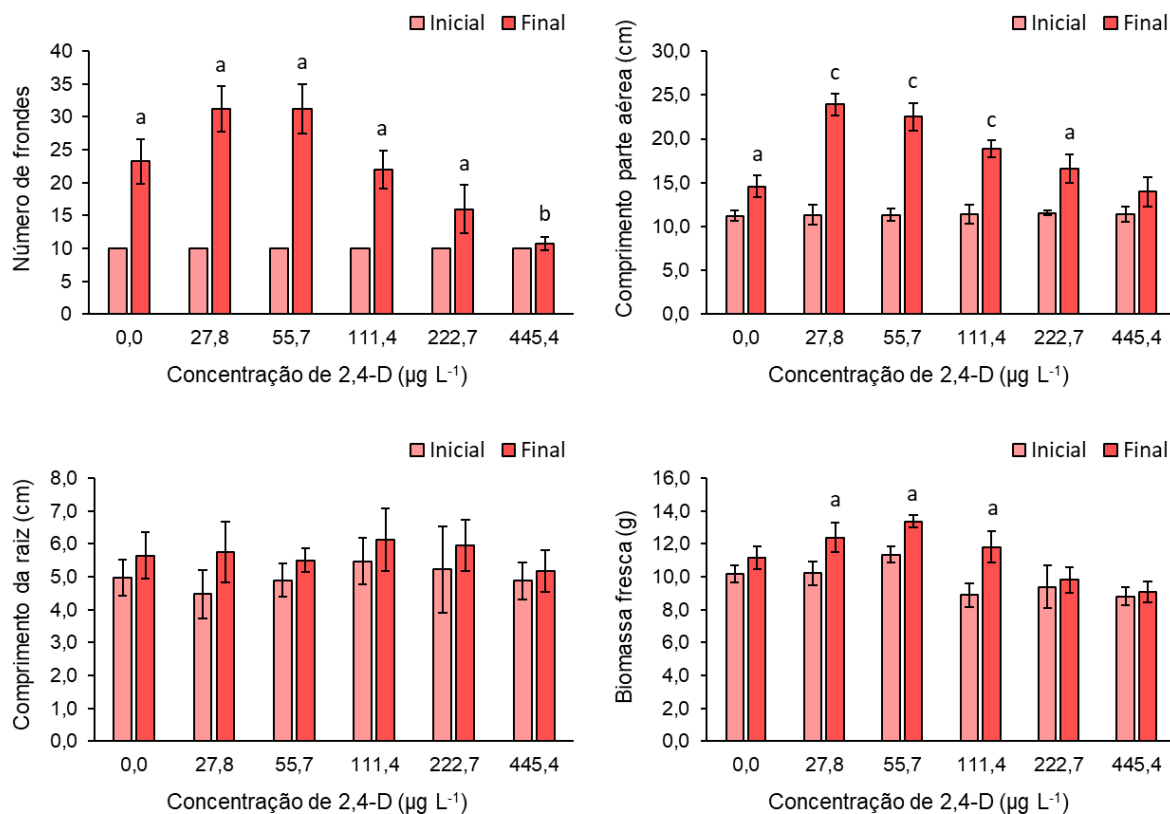
a = diferenças estatísticas significativas em relação ao valor inicial para o mesmo tratamento

b = diferenças estatísticas significativas em relação ao controle não contaminado

c = diferenças estatísticas significativas tanto em relação ao controle não contaminado quanto ao valor inicial

Para o ensaio de fitotoxicidade com *S. auriculata* exposta a diferentes concentrações de 2,4-D (Figura 27), o número de frondes teve aumento significativo após sete dias no controle e nas quatro primeiras concentrações (27,8 a 222,7 $\mu\text{g L}^{-1}$) (ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). Por outro lado, a maior concentração (222,7 $\mu\text{g L}^{-1}$) não apresentou crescimento em relação ao valor inicial, sendo a única concentração com número de frondes significativamente menor que o controle após o período de exposição ($p < 0,05$). Apenas a maior concentração (222,7 $\mu\text{g L}^{-1}$) não apresentou diferenças de crescimento da parte aérea ($p > 0,05$). Porém, houve aumento significativo do comprimento da parte aérea nas três primeiras concentrações (27,8 a 222,7 $\mu\text{g L}^{-1}$) em relação ao crescimento no controle ($p < 0,05$). Não houve diferenças no comprimento da raiz entre os diferentes tratamentos e entre os tamanhos iniciais e finais ($p > 0,05$). A biomassa fresca apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) apenas nas três primeiras concentrações (27,8 a 111,4 $\mu\text{g L}^{-1}$), apesar de não apresentarem diferenças em relação ao crescimento no controle ($p > 0,05$).

Figura 27 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca iniciais e finais (após 7 dias) no ensaio de fitotoxicidade de *Salvinia auriculata* exposta a diferentes concentrações de 2,4-D.



Notas:

Diferenças estatísticas conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey (considerando $p < 0,05$).

a = diferenças estatísticas significativas em relação ao valor inicial para o mesmo tratamento

b = diferenças estatísticas significativas em relação ao controle não contaminado

c = diferenças estatísticas significativas tanto em relação ao controle não contaminado quanto ao valor inicial

Como forma de padronização, as espécies expostas a diferentes concentrações de 2,4-D foram comparadas conforme o aumento percentual dos *endpoints* avaliados (Tabela 20). *S. auriculata* apresentou as maiores taxas de aumento do número de frondes (132,5% no controle e 212,5% nas duas primeiras concentrações). Porém, esse aumento foi menor nas concentrações 114,4 e 222,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (120,0 e 60,0%, respectivamente) e de apenas 7,5% na maior concentração (445,4 $\mu\text{g L}^{-1}$). Dessa forma, é possível observar um aumento inicial do número de frondes, seguido de uma redução. Por outro lado, os aumentos do número de frondes de *E. crassipes* e *P. stratiotes* alcançaram valores máximos de 20,8 e 43,8%, respectivamente. Essa diferença já era esperada, pois o desenvolvimento do número de frondes de *S. auriculata* é mais acelerado

em relação às outras espécies. Para o aumento percentual da parte aérea, raiz e biomassa fresca, não foram observados padrões dose-resposta entre as espécies avaliadas. Para a biomassa fresca de *E. crassipes* e *P. stratiotes*, houve diminuição do valor médio de biomassa fresca nas amostras contaminadas com 2,4-D em relação ao controle; porém, o desvio padrão elevado das amostras avaliadas não atribuiu diferenças estatísticas significativas para esses parâmetros (ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). Para *S. auriculata*, diminuição significativa do aumento de biomassa fresca foi observada apenas na maior concentração ($p < 0,05$).

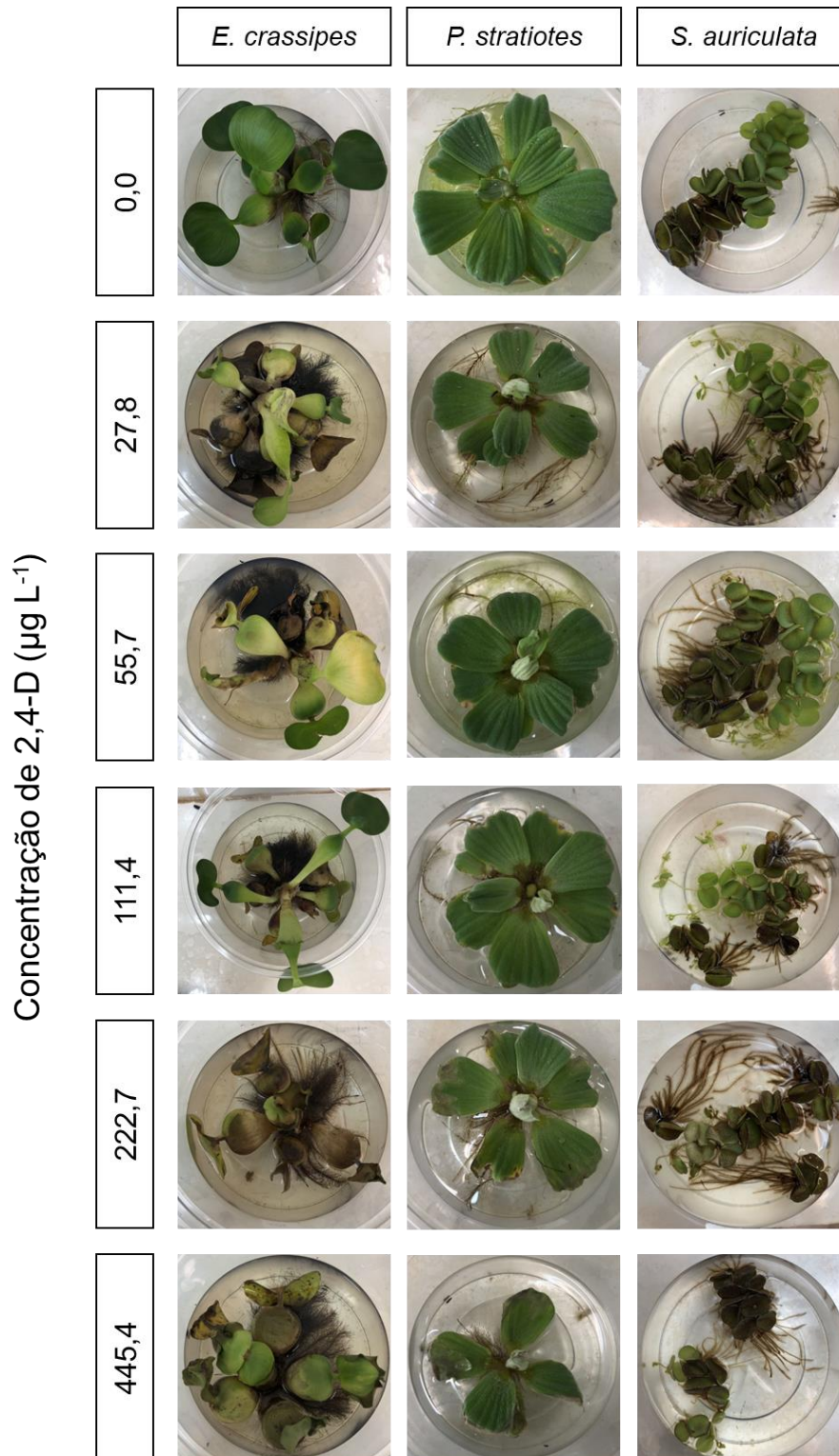
Tabela 20 – Aumento percentual (%) do número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca no ensaio de fitotoxicidade das plantas aquáticas *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia auriculata* expostas a diferentes concentrações de 2,4-D após 7 dias.

Tratamento		<i>E. crassipes</i> – Aumento (%)			
		Número de frondes	Parte aérea	Raiz	Biomassa fresca
2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,0	20,8 ± 16,0	48,1 ± 12,5	25,7 ± 7,6	13,0 ± 7,9
	27,8	12,5 ± 8,3	28,1 ± 18,3	29,3 ± 12,6	9,3 ± 5,0
	55,7	12,5 ± 16,0	27,8 ± 13,8	12,9 ± 4,3	3,4 ± 2,2
	111,4	20,8 ± 16,0	66,2 ± 32,0	7,7 ± 8,7	4,3 ± 1,9
	222,7	4,2 ± 8,3	22,7 ± 3,6	17,9 ± 6,8	4,5 ± 3,6
	445,4	0,0 ± 0,0	20,4 ± 12,1	6,4 ± 3,1	3,9 ± 3,2
Tratamento		<i>P. stratiotes</i> – Aumento (%)			
		Número de frondes	Parte aérea	Raiz	Biomassa fresca
2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,0	12,5 ± 14,4	101,1 ± 32,5	99,5 ± 23,2	30,0 ± 23,1
	27,8	12,5 ± 14,4	79,3 ± 14,3	49,1 ± 15,9	18,9 ± 14,6
	55,7	43,8 ± 23,9	120,1 ± 22,8	37,0 ± 23,3	24,2 ± 8,1
	111,4	25,0 ± 20,4	65,3 ± 33,5	13,0 ± 8,2	25,8 ± 15,8
	222,7	12,5 ± 14,4	96,4 ± 41,0	13,6 ± 6,5	8,0 ± 8,8
	445,4	25,0 ± 28,9	54,5 ± 17,3	6,2 ± 2,1	20,7 ± 7,2
Tratamento		<i>S. auriculata</i> – Aumento (%)			
		Número de frondes	Parte aérea	Raiz	Biomassa fresca
2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,0	132,5 ± 34,0	30,3 ± 12,1	13,6 ± 7,1	9,7 ± 4,4
	27,8	212,5 ± 35,0	112,7 ± 25,4	31,0 ± 31,3	23,4 ± 16,3
	55,7	212,5 ± 37,7	99,4 ± 18,9	12,9 ± 10,9	18,5 ± 6,0
	111,4	120,0 ± 29,4	67,1 ± 17,7	11,6 ± 3,5	34,9 ± 28,5
	222,7	60,0 ± 36,5	44,1 ± 17,2	18,4 ± 27,2	4,6 ± 2,7
	445,4	7,5 ± 9,6	22,5 ± 14,0	6,2 ± 2,6	2,9 ± 2,1

Os efeitos do 2,4-D nas plantas aquáticas expostas também foram avaliados de forma qualitativa para a identificação de efeitos de fitotoxicidade (Figura 28). Frondes de *E. crassipes* e *S. auriculata* apresentaram clorose e necrose quando expostas às maiores concentrações de 2,4-D, como foi possível observar em 222,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as duas espécies. Nas três maiores concentrações de 2,4-D (111,4 a 445,4 $\mu\text{g L}^{-1}$), os organismos de *S. auriculata* se apresentaram mais sensíveis e, durante a troca do meio, ocorreu fragmentação. Nas duas maiores concentrações (222,7 a 445,4 $\mu\text{g L}^{-1}$), *P. stratiotes* também apresentou sintomas de fitotoxicidade, como clorose e amarelamento. Além do efeito herbicida, os sintomas de fitotoxicidade observados para *P. stratiotes* (e.g., clorose e necrose) podem estar associados

com o aumento da salinidade (VÁZQUEZ et al., 2021), uma vez que a formulação comercial utilizada (DMA[®] 806BR) possui 806 g L⁻¹ de sal dimetilamina do ácido 2,4-D.

Figura 28 – Comparação visual do ensaio de fitotoxicidade das plantas aquáticas *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia auriculata* expostas a diferentes concentrações de 2,4-D após 7 dias.



Para o caso do 2,4-D, seria esperado que as plantas apresentassem inibição de crescimento com o aumento do herbicida; porém, o crescimento pode ser acima do controle em baixas concentrações, o que caracterizaria o efeito de Hormesis no padrão dose-resposta. Esse efeito é caracterizado pelo estímulo do crescimento, de forma não linear, em baixas concentrações de um contaminante (AGATHOKLEOUS e CALABRESE, 2019; CALABRESE e BALDWIN, 2000). No presente estudo, esse efeito pode ter ocorrido para *S. auriculata*, que apresentou crescimento acima do controle em relação ao número de frondes e o comprimento da parte aérea quando exposta ao 2,4-D, em especial nas menores concentrações (27,8 a 55,7 $\mu\text{g L}^{-1}$). Em um estudo anterior feito por Belgers et al. (2007), nove macrófitas aquáticas foram testadas quando expostas a diferentes concentrações de 2,4-D (entre 10 e 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$), incluindo *Ceratophyllum demersum*, *Elodea nuttallii*, *Lemna trissulca*, *Myriophyllum spicatum*, *Potamogeton crispus*, *Potamogeton lucens*, *Ranunculus circinatus*, *R. aquatilis* e *R. peltatus*. Para essas macrófitas, as concentrações de efeito variaram entre o comprimento (CE_{50} de 92 a 997 $\mu\text{g L}^{-1}$) e o número de raízes (CE_{50} de 112 a 1807 $\mu\text{g L}^{-1}$). Além disso, esses autores identificaram que ocorreu estímulo de crescimento da parte aérea e das raízes nas baixas concentrações do herbicida (de 10 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$), o que caracterizou o efeito de Hormesis.

O estímulo de crescimento proporcionado pela exposição das plantas aquáticas ao 2,4-D ainda pode ser mais explorado. Por exemplo, Dolui et al. (2022) indicaram estímulo de crescimento de *Salvinia natans* L. quando exposta a doses subletais de 2,4-D (de até 500 μM), além de aumentar o potencial de acumulação de sódio e de arsênio. Em outro estudo, Dolui et al. (2021) destacaram o potencial de *S. natans* L. em bioacumular o 2,4-D com tempo de contato de 48 h, obtendo eficiências de remoção de 75 e 63% para concentrações iniciais de 100 e 500 μM , respectivamente.

Vale ressaltar que os efeitos observados nas plantas aquáticas avaliadas foram referentes a um curto período de exposição (7 dias). A longo prazo, quando expostas no ambiente ao 2,4-D, essas plantas podem apresentar efeitos mais evidentes. Por exemplo, o estudo de Ebke et al. (2013) indicou que, para a macrófita *M. aquaticum* exposta ao 2,4-D por 7 dias, o comprimento da raiz ($CE_{50} = 157,8 \mu\text{g L}^{-1}$) foi o *endpoint* mais sensível em comparação com a biomassa fresca e o comprimento da parte aérea ($CE_{50} > 2000 \mu\text{g L}^{-1}$ para os dois casos). Esses autores identificaram que o aumento do período de exposição ao 2,4-D contribui para a fitotoxicidade, uma vez que a concentração de efeito foi significativamente menor quando as macrófitas foram expostas por 28 dias ($CE_{50} = 46,9 \mu\text{g L}^{-1}$). A macrófita *M. aquaticum* apresentou valor de CE_{50} de $230 \mu\text{g L}^{-1}$ (TUNIC' et al., 2015).

O uso de plantas aquáticas para a avaliação ecotoxicológica ainda é menos difundido quando comparado com os animais como modelos biológicos; porém, esses organismos desempenham funções importantes como a produtividade primária em ecossistemas aquáticos (CESCHIN et al., 2021). A sub-hipótese 2 da presente tese foi parcialmente respondida pelos resultados de fitotoxicidade de plantas aquáticas. O aumento de toxicidade decorrente do 2,4-D para as plantas expostas ocorreu apenas nas maiores concentrações, sendo que houve estímulo de crescimento em concentrações menores. Dessa forma, os efeitos de agrotóxicos em plantas aquáticas podem comprometer o desenvolvimento da biomassa vegetal e, por consequência, os seus serviços ecossistêmicos associados. O fipronil não apresentou efeitos de inibição ou estímulo de crescimento para as plantas aquáticas estudadas dentro das concentrações testadas. Apesar do fipronil não ter apresentado fitotoxicidade nas concentrações avaliadas, esse inseticida pode interferir na fauna associada às macrófitas ou ser bioacumulado nas plantas aquáticas, o que compromete as interações biológicas nos ecossistemas (CESCHIN et al., 2021). Da mesma forma reportada para as plantas terrestres,

não foi possível determinar os efeitos de sinergismo ou antagonismo quando as plantas foram expostas à mistura dos agrotóxicos.

6.4. Fitorremediação de solos contaminados com agrotóxicos

Os resultados de quantificação química dos agrotóxicos nas amostras de solo avaliadas no experimento de fitorremediação de solos contaminados foram apresentados na Tabela 21. Resíduos de 2,4-D e fipronil foram detectados em todas as amostras compostas destinadas à quantificação química e, portanto, é possível que tenha ocorrido contaminação cruzada durante o experimento ou durante o preparo das amostras para as análises químicas. Os subprodutos da degradação do fipronil por oxidação e redução (i.e., fipronil sulfona e fipronil sulfeto, respectivamente) foram quantificados, mas não houve quantificação dos metabólitos do 2,4-D (i.e., 2,4-diclorofenol, 4-clorofenol e 2,4-dicloro-1-metoxibenzeno) e dos subprodutos da degradação do fipronil por hidrólise (i.e., fipronil amida) e fotólise (i.e., fipronil desulfonil).

Tabela 21 – Concentrações nas amostras de solo analisadas após o experimento de fitorremediação de solos contaminados com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 30 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3).

Tratamento	Planta	2,4-D ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fipronil ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fipronil sulfeto ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fipronil sulfona ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Controle	SP	0,311	0,087	<LQ	0,022
	PT1	0,718	0,187	<LQ	0,071
	PT2	0,457	0,065	<LQ	0,027
	PT3	0,412	0,080	<LQ	0,046
2,4-D	SP	1,350	0,112	<LQ	0,041
	PT1	1,450	0,163	<LQ	0,028
	PT2	1,130	0,085	<LQ	0,021
	PT3	1,380	0,185	<LQ	0,048
Fipronil	SP	0,492	33,548	0,348	1,580
	PT1	2,110	33,228	0,349	2,070
	PT2	0,404	35,428	0,382	2,160
	PT3	0,398	42,221	0,461	2,730
Mistura	SP	1,290	32,659	0,323	1,842
	PT1	1,554	30,674	0,285	1,514
	PT2	1,252	50,834	0,494	2,767
	PT3	1,307	44,976	0,419	2,221

Notas:

Concentração inicial de 23,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de 2,4-D e 20,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de fipronil, considerando mistura 1:1.

LQ = 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o 2,4-D e 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o fipronil e seus metabólitos.

As menores concentrações de 2,4-D ao final do experimento podem ser decorrentes do menor tempo de meia-vida desse herbicida, que varia entre 7 e 14 dias (BOIVIN et al., 2005; MERINI et al., 2007). Ademais, devido à alta solubilidade (677 mg L^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) (KIM et al., 2021), o 2,4-D pode ter migrado para as camadas mais inferiores do solo-teste durante a irrigação dos experimentos. Por outro lado, o fipronil apresentou concentrações superiores nos tratamentos isolado ($33,2$ a $42,2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) e em mistura ($30,6$ a $50,8 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) em relação ao valor inicial quantificado ($20,2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). Isso pode ser explicado devido à menor mobilidade no solo (solubilidade entre $1,9$ e $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e K_{OC} entre 825 e 6863) e a tendência de permanecer nas camadas superficiais (CHATTERJEE e GUPTA, 2010; KIM et al., 2021), além do tempo de meia vida do fipronil ser superior ao período do experimento de fitorremediação (MANDAL e SINGH, 2013). No estudo de Ramborger et al. (2017), a espécie *Plectranthus neochilus* (i.e., boldo miúdo) apresentou resistência às concentrações de 2,4-D testadas (até $11,42 \text{ kg ha}^{-1}$) dentro do período do experimento (15 dias). Porém, não é possível afirmar que essa espécie apresentou potencial para a degradação do 2,4-D, uma vez que o período de exposição foi superior ao tempo de degradação natural do composto.

Resíduos de 2,4-D foram detectados apenas nas raízes da PT1 ($4,0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), o que indica uma possível contaminação cruzada desse herbicida (Tabela 22). De forma análoga, resíduos de fipronil foram detectados na parte aérea da PT2 ($0,2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) e em todas as amostras de parte aérea e raiz das três plantas dos tratamentos com 2,4-D isolado, particularmente nas raízes da PT1 ($10,4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e entre $0,1$ e $0,4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ nas demais amostras). Para as amostras do tratamento com fipronil isolado e em mistura, esse inseticida foi detectado em todas as amostras, sendo que o acúmulo ocorreu principalmente nas raízes para as três plantas. Fipronil sulfeto só foi detectado na parte aérea da PT3 no tratamento com fipronil isolado ($0,1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). Fipronil sulfona foi detectado na parte aérea da PT2 no controle ($0,1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), nas raízes da PT1 no

tratamento com 2,4-D ($1,7 \mu\text{g kg}^{-1}$) e em todas as amostras dos tratamentos com fipronil isolado (entre $0,3$ e $3,1 \mu\text{g kg}^{-1}$) e em mistura (entre $0,5$ e $3,4 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabela 22 – Concentrações dos agrotóxicos acumulados nas amostras de parte aérea (PA) e raiz (R) de *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3), após o experimento de fitorremediação de solos contaminados com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 30 dias.

Tratamento	Planta	Amostra	2,4-D ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fipronil ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fipronil sulfeto ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fipronil sulfona ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Controle	PT1	PA	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
		R	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	PT2	PA	<LQ	0,2	<LQ	0,1
		R	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	PT3	PA	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
		R	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
2,4-D	PT1	PA	<LQ	0,1	<LQ	<LQ
		R	<LQ	10,4	<LQ	1,7
	PT2	PA	<LQ	0,4	<LQ	<LQ
		R	<LQ	0,3	<LQ	<LQ
	PT3	PA	<LQ	0,1	<LQ	<LQ
		R	<LQ	0,1	<LQ	<LQ
Fipronil	PT1	PA	<LQ	1,1	<LQ	3,1
		R	4,0	9,0	<LQ	1,1
	PT2	PA	<LQ	1,6	<LQ	0,3
		R	<LQ	5,1	<LQ	0,8
	PT3	PA	<LQ	7,7	0,1	1,2
		R	<LQ	8,4	<LQ	2,5
Mistura	PT1	PA	<LQ	0,8	<LQ	3,4
		R	<LQ	10,0	<LQ	1,5
	PT2	PA	<LQ	2,8	<LQ	0,5
		R	<LQ	4,3	<LQ	1,0
	PT3	PA	<LQ	5,7	<LQ	0,9
		R	<LQ	6,7	<LQ	2,4

Notas:

Concentração inicial de $23,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ de 2,4-D e $20,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de fipronil, considerando mistura 1:1.

LQ = $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o 2,4-D e $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o fipronil e seus metabólitos.

Os índices FBC, FBA e FT foram calculados com base nas concentrações reportadas na parte aérea e na raiz das plantas em relação aos valores no solo (Tabela 23). Apenas a PT3 foi capaz de acumular 2,4-D, particularmente nas raízes (FBC = FBA = 1,9). Assim, não foi possível calcular os índices para 2,4-D para as outras plantas estudadas. Para o fipronil, a PT2

apresentou FBA de 3,08 mesmo no tratamento controle. No tratamento D, a PT1 apresentou valores muito altos para FBC e FBA (63,8 e 64,4, respectivamente), o que indicaria que essa planta pode ser hiperacumuladora para o 2,4-D. Porém, as concentrações de fipronil foram relativamente mais baixas nesses tratamentos (entre 0,085 e 0,185 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e apenas o valor de bioacumulação de fipronil nas raízes da PT1 (10,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$) foi discrepante em relação aos demais em D (0,1 a 0,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Considerado apenas os tratamentos F e M, a PT1 foi a espécie que mais bioconcentrou fipronil (FBC de 0,27 e 0,31, respectivamente). Os valores de FBA foram maiores para a PT1 e a PT3 nos tratamentos F (0,30 e 0,38, respectivamente) e M (0,33 e 0,28, respectivamente). Por outro lado, a PT2 e a PT3 apresentaram maior potencial de translocação dentre as espécies testadas, uma vez que foram capazes de acumular quantidade maior na parte aérea em relação às raízes. Porém, a maior bioacumulação de fipronil ocorreu nas raízes, uma vez que os valores de FT foram inferiores a 1,0.

Tabela 23 – Fator de bioconcentração (FBC), fator de bioacumulação (FBA) e fator de translocação (FT) para os agrotóxicos acumulados nas amostras de *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3), após o experimento de fitorremediação de solos contaminados com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 30 dias.

Tratamento	Planta	2,4-D			Fipronil		
		FBC	FBA	FT	FBC	FBA	FT
Controle	PT1	-	-	-	-	-	-
	PT2	-	-	-	-	3,08	-
	PT3	-	-	-	-	-	-
2,4-D	PT1	-	-	-	63,80	64,42	0,01
	PT2	-	-	-	3,53	8,24	1,33
	PT3	-	-	-	0,54	1,08	1,00
Fipronil	PT1	-	-	-	0,27	0,30	0,12
	PT2	-	-	-	0,14	0,19	0,31
	PT3	1,90	1,90	-	0,20	0,38	0,92
Mistura	PT1	-	-	-	0,31	0,33	0,08
	PT2	-	-	-	0,08	0,14	0,65
	PT3	-	-	-	0,15	0,28	0,85

Apesar de os resíduos de agrotóxicos não terem sido quantificados no elutriato, foi possível indicar a presença conforme as concentrações no solo e diante do comportamento esperado em relação à sua disponibilidade para a fase aquosa. O 2,4-D apresenta baixa afinidade à matéria orgânica do solo ($K_{OC} = 20$ a 136), ou seja, espera-se que esse herbicida apresente alta mobilidade que, associada à alta solubilidade (540 mg L^{-1} a 20 °C), indica maior probabilidade desse composto estar presente na fase aquosa do elutriato avaliado. Por outro lado, o fipronil apresenta baixa solubilidade ($1,9$ a $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ a 20 °C) e elevados valores de K_{OC} (825 a 6863), indicando reduzida mobilidade no solo. Dessa forma, as amostras de elutriato geradas após os experimentos de fitorremediação tendem a apresentar menores concentrações de fipronil.

A espécie *Crotalaria juncea* foi utilizada em um ensaio de fitorremediação de 2,4-D em três concentrações diferentes ($0,2$, $0,5$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) por 30 dias (COSTA et al., 2022a). Os autores indicaram que a *C. juncea* possui potencial para a fitorremediação do 2,4-D uma vez que houve redução nas concentrações residuais desse herbicida nos três tratamentos (100, 24 e 32%, respectivamente). Entretanto, os autores não incluíram a avaliação de um tratamento SP (i.e., controle-negativo) para as três concentrações utilizadas, indicando que o 2,4-D pode ter se degradado naturalmente durante o período do experimento. Conforme apresentado pelos autores, como não foi possível definir se a planta degradou ou acumulou o herbicida, existem riscos da disposição dos resíduos da fitorremediação de forma inadequada. As plantas de adubação orgânica são utilizadas para fornecer nutrientes aos plantios e, caso não ocorra a degradação, podem reinserir os agrotóxicos no ambiente.

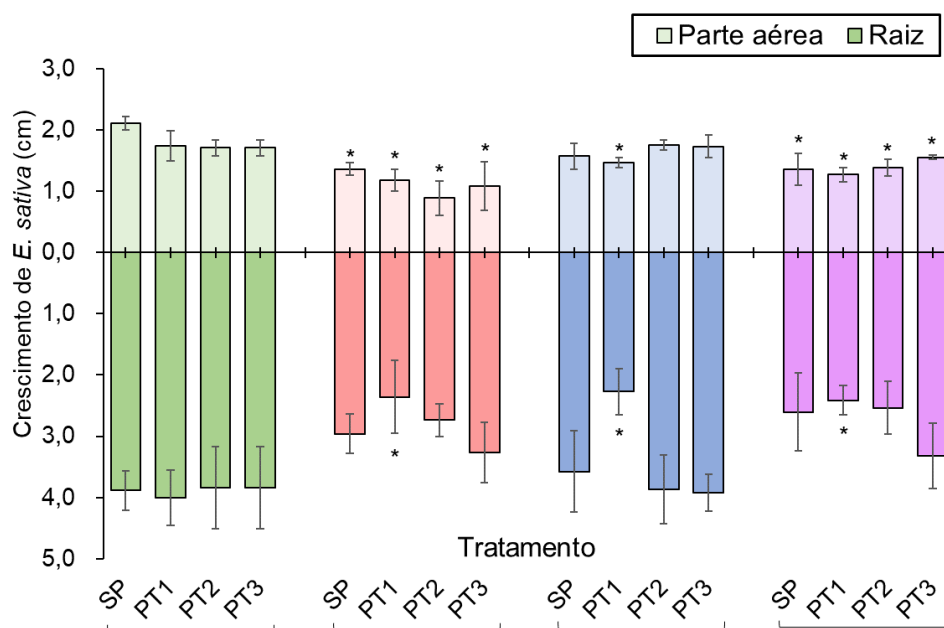
Na ausência da quantificação química, uma avaliação ecotoxicológica com organismos de, pelo menos, dois níveis tróficos, pode contribuir para indicar a qualidade do solo. Assim, ensaios de germinação de sementes de *E. sativa* L. foram feitos com as amostras de elutriato preparadas com o solo do experimento de fitorremediação utilizando as plantas PT1, PT2 e

PT3 (Tabela 24 e Figura 29). Para o *endpoint* de germinação (ANOVA, $F = 2,22$, $p > 0,05$), considerando o *post hoc* de Tukey ($p > 0,05$), não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Para a parte aérea das plântulas germinadas, os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas (ANOVA, $F = 6,39$, $p < 0,05$), incluindo todos os tratamentos D e M, além da PT1 em F. Esse efeito em F não era esperado, uma vez que não foram identificados efeitos do fipronil nos ensaios de fitotoxicidade. Porém, no tratamento F com a PT1, resíduos de 2,4-D foram detectados na amostra de solo ($2,11 \mu\text{g kg}^{-1}$), o que justifica o menor crescimento das plântulas *E. sativa* L. quando expostas ao elutriato. Para o *endpoint* de raiz das plântulas germinadas, diferenças estatísticas significativas foram observadas entre os tratamentos (ANOVA, $F = 0,67$, $p = 0,79$), em especial para PT1 em D, F e M.

Tabela 24 – Ensaios de ecotoxicidade para avaliação da germinação de sementes de *Eruca sativa* L. expostas às amostras de elutriato feito com o solo do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 30 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3).

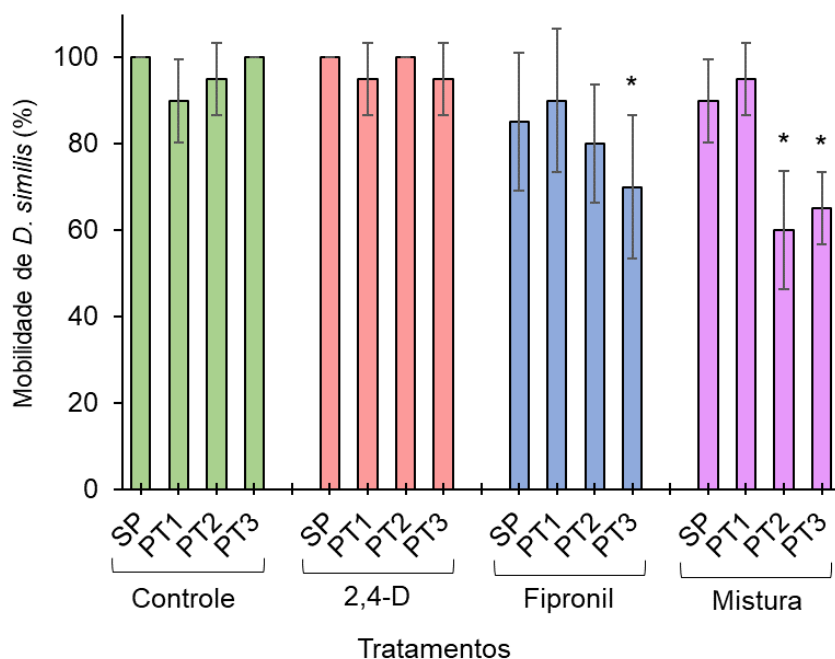
Tratamento	Planta	Germinação (%)	Parte aérea (cm)	Raiz (cm)
Controle	SP	93,3 ± 5,8	2,1 ± 0,1	3,9 ± 0,3
	PA1	83,3 ± 5,8	1,7 ± 0,2	4,0 ± 0,5
	PA2	90,0 ± 0,0	1,7 ± 0,1	3,8 ± 0,7
	PA3	90,0 ± 0,0	1,7 ± 0,1	3,8 ± 0,7
2,4-D	SP	90,0 ± 10,0	1,4 ± 0,1	3,0 ± 0,3
	PA1	76,7 ± 5,8	1,2 ± 0,2	2,4 ± 0,6
	PA2	87,7 ± 5,8	0,9 ± 0,3	2,7 ± 0,3
	PA3	83,3 ± 5,8	1,1 ± 0,4	3,3 ± 0,5
Fipronil	SP	93,3 ± 11,5	1,6 ± 0,2	3,6 ± 0,7
	PA1	90,0 ± 10,0	1,5 ± 0,1	2,3 ± 0,4
	PA2	83,3 ± 5,8	1,8 ± 0,1	3,9 ± 0,6
	PA3	90,0 ± 10,0	1,7 ± 0,2	3,9 ± 0,3
Mistura	SP	100,0 ± 0,0	1,4 ± 0,3	2,6 ± 0,6
	PA1	90,0 ± 10,0	1,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2
	PA2	86,7 ± 15,3	1,4 ± 0,1	2,5 ± 0,4
	PA3	93,3 ± 5,8	1,6 ± 0,0	3,3 ± 0,5

Figura 29 – Ensaio de ecotoxicidade para avaliação da germinação de sementes de *Eruca sativa* L. expostas às amostras de elutriado feito com o solo do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 30 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3).



Os ensaios de ecotoxicidade aguda com *D. similis* consideraram a mobilidade (%) dos organismos expostos, por 48 h, às amostras de elutriado do experimento de fitorremediação com as plantas PT1, PT2 e PT3 (Figura 30). Os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si (ANOVA, $F = 4,31$, $p < 0,05$), em especial considerando o *post hoc* de Tukey, para a PA3 nos tratamentos F e M e PA2 no tratamento F, que não foram diferentes do controle ($p < 0,05$). Não foram encontrados estudos na literatura que abordassem a avaliação de ecotoxicidade dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil para *D. similis*. Porém, outras espécies do mesmo gênero, como *Daphnia pulex* e *Daphnia magna*, apresentaram CE_{50} entre 15,6 e 40,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ (STARK e VARGAS, 2005) e CE_{50} entre 70 e 380 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PINO-OTÍN et al., 2021) respectivamente, quando expostas ao fipronil.

Figura 30 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Daphnia similis* expostos às amostras de elutriado do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3).



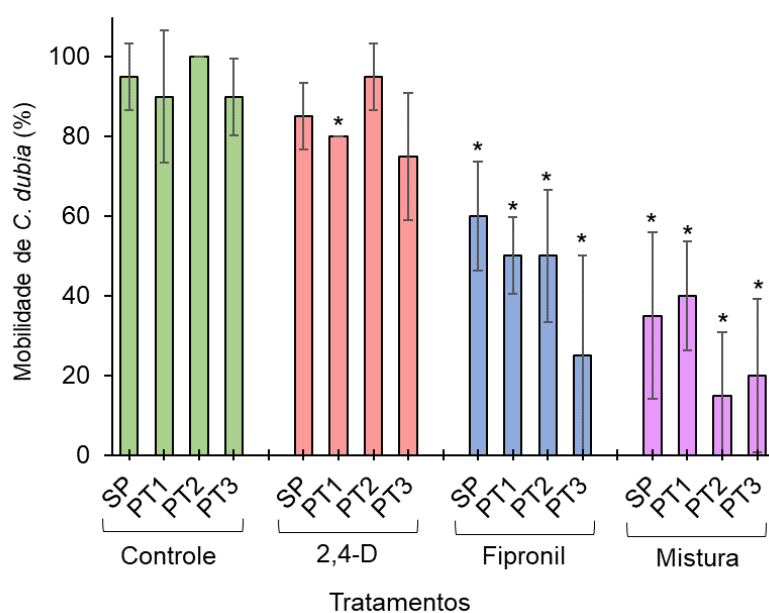
Nota:

Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle C ($p < 0,05$) identificadas com um asterisco (*), conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

Os ensaios com *C. dubia* (Figura 31) e *C. silvestrii* (Figura 32) apresentaram comportamento similar de redução da sobrevivência nas amostras de elutriado avaliadas provenientes dos tratamentos F e M ($p < 0,05$). Entretanto, a espécie *C. silvestrii* teve maior sensibilidade a esses tratamentos, com menores valores médios dos números de sobrevivência de organismos. Para *C. dubia*, a amostra proveniente do tratamento D com a aPT1 foi diferente do controle ($95,0 \pm 8,3\%$), apesar do valor relativamente elevado ($80,0 \pm 0,0\%$). Para *C. silvestrii*, mesmo as amostras presentes no controle obtiveram redução de sobrevivência (entre 75 e 90%). Isso pode indicar maior sensibilidade dessa espécie ao próprio elutriado, uma vez que os sólidos suspensos e a turbidez podem interferir na alimentação dos organismos e afetar a sobrevivência. Da mesma forma, concentrações de efeito maiores para *C. dubia* e *Ceriodaphnia reticulata* ($CE_{50} = 0,99$ e $8,83 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) foram encontradas na literatura em comparação com *C. silvestrii* ($3,9 \mu\text{g L}^{-1}$) (HAYASAKA et al., 2012; SILVA et

al., 2020). As concentrações de efeito para 2,4-D são maiores para *C. silvestrii* ($CE_{50} = 169,0 \mu\text{g L}^{-1}$) (SILVA et al., 2020).

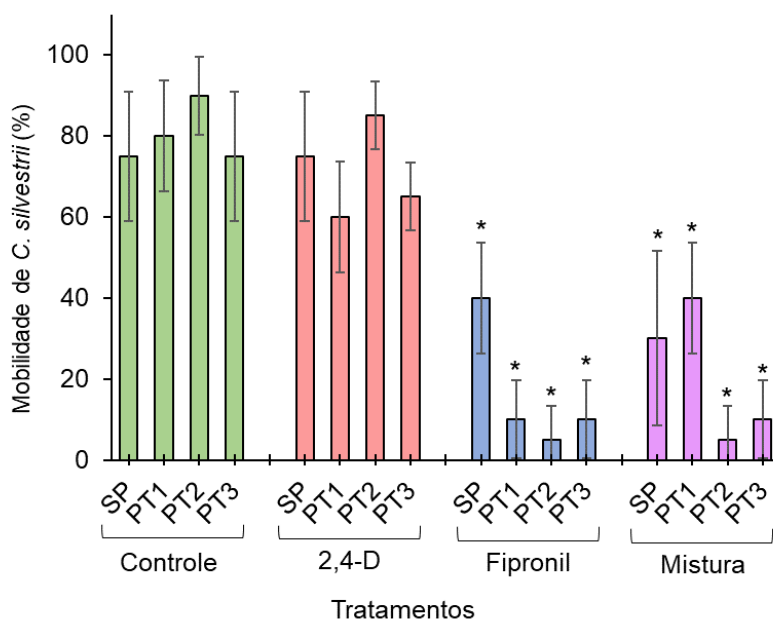
Figura 31 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Ceriodaphnia dubia* expostos às amostras de elutriado do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3).



Nota:

Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle C ($p < 0,05$) identificadas com um asterisco (*), conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

Figura 32 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos às amostras de elutriato do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3).



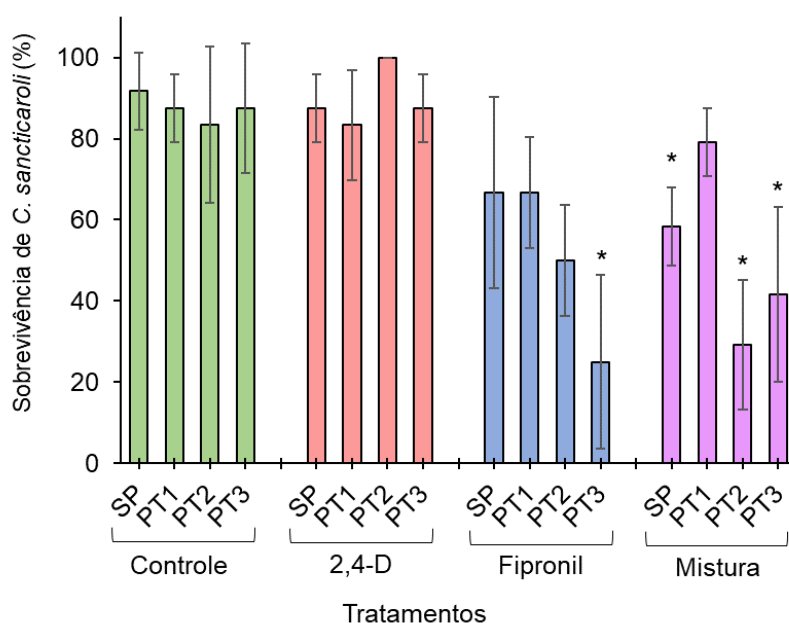
Nota:

Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle C ($p < 0,05$) identificadas com um asterisco (*), conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

Em relação às larvas de *C. sancticaroli* expostas às amostras de elutriato (Figura 33), redução significativa da sobrevivência apenas ocorreu nas amostras de fipronil com a PT3 e mistura sem planta e com as plantas PT2 e PT3 ($p < 0,05$). As demais amostras do tratamento de fipronil e mistura com a PT1 foram semelhantes em relação ao controle ($p > 0,05$), mesmo que os valores médios de sobrevivência tenham sido menores nesses tratamentos. Isso pode ser justificado pelo grande desvio padrão das amostras (de 13,6 a 23,6% para fipronil e entre 8,3 e 21,5% para mistura). Para uma avaliação adicional, as larvas de *C. sancticaroli* foram expostas diretamente às amostras de solo, que foram utilizadas como o sedimento para novos testes de ecotoxicidade aguda (Figura 34). Nesse cenário, foi possível observar que as amostras presentes nos tratamentos com fipronil e mistura apresentaram efeitos significativamente mais tóxicos aos organismos expostos em relação ao controle ($p < 0,05$). Entretanto, vale ressaltar o decréscimo nos valores médios de sobrevivência nos tratamentos C e D em relação ao ensaio

com as amostras de elutriato. Para esses tratamentos, o desvio padrão esteve entre 8,3 e 25,0%, o que aponta grande variabilidade dos resultados para a mesma amostra que foi avaliada. Isso pode ser justificado pela própria adaptação do teste, uma vez que os organismos foram expostos a condições não ideais durante as 96 h de exposição (i.e., amostras de solo foram utilizadas no lugar da areia calcinada).

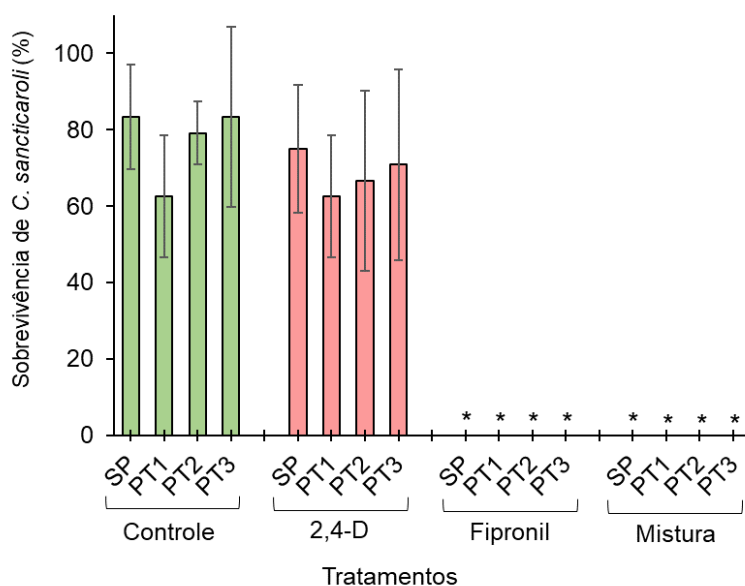
Figura 33 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (96 h) com larvas de *Chironomus sancticaroli* expostos às amostras de elutriato do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3).



Nota:

Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle C ($p < 0,05$) identificadas com um asterisco (*), conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

Figura 34 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (96 h) com larvas de *Chironomus sancticaroli* utilizando as amostras de solo como sedimento após o ensaio de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Canavalia ensiformis* (PT1), *Mucuna pruriens* (PT2) e *Dolichos lablab* (PT3).



Nota:

Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle C ($p < 0,05$) identificadas com um asterisco (*), conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

No trabalho de Pinto et al. (2021), considerando 8 dias de exposição, o fipronil apresentou maior potencial de toxicidade à espécie *C. sancticaroli* ($CE_{50} = 3,7 \mu\text{g L}^{-1}$) em relação ao 2,4-D ($CE_{50} > 426,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Dessa forma, esses autores também identificaram o fipronil como sendo o principal responsável pela toxicidade decorrente da exposição à mistura dos agrotóxicos. Outros autores também identificaram a sensibilidade de quironomídeos expostos ao fipronil. Weston e Lydy (2014) indicaram que *C. dilutus* foi a espécie mais sensível em ensaios de ecotoxicidade aguda (96 h) quando exposta ao fipronil e aos subprodutos fipronil sulfona e fipronil sulfeto ($CE_{50} = 1593, 748$ e 1356 ng L^{-1} , respectivamente) em comparação com outras 14 espécies de macroinvertebrados bentônicos. Em concentrações ainda menores, os autores identificaram inibição da capacidade de reação a estímulos para *C. dilutus* expostos ao fipronil, ao fipronil sulfona e fipronil sulfeto ($CE_{50} = 729, 271$ e 540 ng L^{-1} , respectivamente). Vale ressaltar que, nesse estudo, os subprodutos de degradação do fipronil

tiveram caráter mais tóxico aos organismos expostos em relação ao composto parental, o que pode reforçar a ocorrência de ecotoxicidade das amostras provenientes dos tratamentos F e M.

Outras estratégias podem ser associadas à fitorremediação para aumento da eficiência de remoção ou degradação dos agrotóxicos. Germaine et al. (2006) avaliaram fitorremediação de 2,4-D da espécie *Pisum sativum* (ervilha) em associação com o endófito bacteriano geneticamente modificado de *Pseudomonas putida*, que auxiliou na degradação do composto e na redução da fitotoxicidade. Romeh (2018) identificou que a fitorremediação de fipronil de água e solos contaminados pode ser melhorada com o auxílio de nanopartículas com capacidade de degradação. A adição de glicose pode promover melhor mobilidade de fipronil pelo floema (YANG et al., 2011; YUAN et al., 2013), o que poderia beneficiar o processo de fitorremediação.

Diante dos resultados apresentados, a sub-hipótese 2 da presente pesquisa não foi aceita, uma vez que as plantas utilizadas não foram capazes de reduzir as concentrações dos agrotóxicos nas amostras de solo. A PT1, mesmo sendo a planta menos sensível ao 2,4-D nos ensaios de fitotoxicidade (Seção 6.2), não apresentou maior potencial de fitorremediação em comparação com as outras espécies. Entretanto, vale ressaltar que as concentrações utilizadas no experimento de fitorremediação ($23,7 \mu\text{g kg}^{-1}$) foram menores que as utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade (60 a $1.230 \mu\text{g kg}^{-1}$) com o intuito de não ocasionar efeitos nas plantas testadas.

Da mesma forma, a sub-hipótese 3 não foi aceita, uma vez que as amostras de solo não apresentaram redução das concentrações dos agrotóxicos em comparação com o tratamento SP, nem atenuação da ecotoxicidade aos organismos bioindicadores utilizados. Mesmo após a fitorremediação, efeitos no crescimento de *E. sativa* L. foram atribuídos principalmente aos resíduos de 2,4-D presentes nas amostras. Por outro lado, resíduos de fipronil ocasionaram

imobilidade dos cladóceros *C. dubia* e *C. silvestrii* e letalidade do inseto *C. sancticaroli*, especialmente quando as amostras de solo foram utilizadas como sedimento dos bioensaios.

A sub-hipótese 4 foi respondida para todas as plantas em relação ao fipronil, tanto nos tratamentos de forma isolada quanto em mistura. A bioacumulação desse inseticida ocorreu principalmente nas raízes das plantas utilizadas ($FT < 1,0$), sendo que não foi possível considerar as plantas como hiperacumuladoras, pois os valores de FBC e FBA foram menores que 1,0. Essa hipótese não foi aceita devido à ausência de bioacumulação de 2,4-D em plantas terrestres nos tratamentos D e M, que pode estar associada à própria toxicidade desse composto.

6.5. Fitorremediação de águas contaminadas com agrotóxicos

Os parâmetros de qualidade da água ao final do experimento foram apresentados na Tabela 25. As plantas aquáticas utilizadas nos experimentos de fitorremediação de águas contaminadas com os agrotóxicos isolados e em mistura foram avaliadas conforme o número de frondes, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e biomassa fresca. Os valores médios desses *endpoints* foram apresentados para as macrófitas no início e ao final do experimento (Tabela 26). Em geral, PA2 apresenta maior tamanho em comparação com as duas espécies, considerando tanto a parte aérea quanto a raiz. Por outro lado, PA1 apresentou maior crescimento relativo entre o início e o final do teste. Como as concentrações utilizadas foram baixas ($158,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D e $32,6 \mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil), não foram observados sintomas de fitotoxicidade nas plantas aquáticas utilizadas, bem como o crescimento relativo de todas as espécies foram similares aos respectivos controles. Essas observações estão de acordo com os padrões de crescimento das macrófitas apresentados na Seção 6.3.

Tabela 25 – Parâmetros físicos e químicos, incluindo pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido, ao final do experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias, considerando os tratamentos com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).

Tratamentos	pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Oxigênio dissolvido ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)
Controle	SP	$7,52 \pm 0,13$	998 ± 42
	PA1	$7,91 \pm 0,10$	1007 ± 23
	PA2	$7,74 \pm 0,22$	1163 ± 20
	PA3	$8,97 \pm 0,20$	987 ± 17
2,4-D	SP	$7,12 \pm 0,06$	957 ± 54
	PA1	$7,98 \pm 0,21$	983 ± 52
	PA2	$7,90 \pm 0,11$	973 ± 33
	PA3	$8,78 \pm 0,12$	906 ± 26
Fipronil	SP	$7,33 \pm 0,03$	1022 ± 16
	PA1	$7,96 \pm 0,08$	1031 ± 12
	PA2	$7,59 \pm 0,06$	988 ± 62
	PA3	$8,03 \pm 0,12$	905 ± 19
Mistura	SP	$7,08 \pm 0,19$	933 ± 22
	PA1	$8,08 \pm 0,16$	981 ± 8
	PA2	$7,51 \pm 0,11$	895 ± 19
	PA3	$8,88 \pm 0,22$	876 ± 56

Tabela 26 – Número de frondes, comprimento da parte aérea, tamanho da raiz e biomassa fresca das macrófitas no início e ao final do experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias, considerando os tratamentos com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).

Tratamento	Endpoint	Experimento	<i>S. auriculata</i>	<i>E. crassipes</i>	<i>P. stratiotes</i>	
Controle	Número de frondes	Inicial	10 ± 0	6 ± 0	4 ± 0	
		Final	14 ± 2	7 ± 0	5 ± 1	
	Parte aérea (cm)	Inicial	7,8 ± 0,8	10,4 ± 0,7	5,5 ± 0,8	
		Final	9,7 ± 1,6	11,4 ± 2,6	6,0 ± 0,6	
	Raiz (cm)	Inicial	8,1 ± 1,0	8,8 ± 0,9	7,7 ± 1,0	
		Final	10,0 ± 1,1	9,2 ± 1,9	11,2 ± 3,6	
	Biomassa fresca (g)	Inicial	10,0 ± 2,8	29,3 ± 6,0	8,8 ± 2,1	
		Final	11,1 ± 2,9	35,4 ± 9,4	12,0 ± 2,4	
	2,4-D	Número de frondes	Inicial	10 ± 0	6 ± 0	4 ± 0
			Final	17 ± 4	7 ± 1	5 ± 1
Parte aérea (cm)		Inicial	8,0 ± 0,6	10,4 ± 0,3	5,2 ± 1,0	
		Final	10,8 ± 1,5	15,2 ± 2,6	5,2 ± 0,7	
Raiz (cm)		Inicial	7,2 ± 1,1	8,6 ± 1,1	8,6 ± 1,1	
		Final	9,0 ± 2,9	8,9 ± 1,0	8,6 ± 1,1	
Biomassa fresca (g)		Inicial	7,3 ± 1,1	29,7 ± 7,0	9,6 ± 3,0	
		Final	10,2 ± 1,2	34,6 ± 5,4	11,8 ± 3,6	
Fipronil		Número de frondes	Inicial	10 ± 0	6 ± 0	4 ± 0
			Final	14 ± 3	7 ± 0	6 ± 1
	Parte aérea (cm)	Inicial	7,6 ± 0,8	10,2 ± 1,0	5,5 ± 0,7	
		Final	9,3 ± 1,7	10,7 ± 1,2	5,7 ± 0,8	
	Raiz (cm)	Inicial	7,2 ± 0,9	8,6 ± 0,6	9,7 ± 0,5	
		Final	7,7 ± 0,8	8,7 ± 0,8	10,2 ± 1,0	
	Biomassa fresca (g)	Inicial	12,2 ± 1,3	20,7 ± 6,1	9,6 ± 1,8	
		Final	12,4 ± 2,9	25,9 ± 8,3	10,9 ± 2,2	
	Mistura	Número de frondes	Inicial	10 ± 0	6 ± 0	4 ± 0
			Final	20 ± 3	8 ± 1	7 ± 2
Parte aérea (cm)		Inicial	7,5 ± 0,8	9,2 ± 0,5	5,3 ± 0,9	
		Final	10,3 ± 1,8	13,8 ± 1,4	6,2 ± 1,0	
Raiz (cm)		Inicial	7,9 ± 0,7	8,1 ± 0,6	8,8 ± 1,3	
		Final	7,8 ± 1,6	8,6 ± 0,7	8,9 ± 1,5	
Biomassa fresca (g)		Inicial	12,2 ± 1,3	26,6 ± 4,8	11,0 ± 3,1	
		Final	15,5 ± 3,8	27,5 ± 6,4	12,2 ± 3,1	

Notas:

Concentração inicial de 158,2 µg L⁻¹ de 2,4-D e 32,6 µg L⁻¹ de fipronil, considerando mistura 1:1.

LQ = 5,0 µg L⁻¹ para o 2,4-D, 0,1 µg L⁻¹ para o fipronil e fipronil sulfona e 0,5 µg L⁻¹ para o fipronil sulfide.

As concentrações dos agrotóxicos obtidas nas amostras de água analisadas após o experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, foram apresentadas na Tabela 27, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *S. auriculata* (PA1), *E. crassipes* (PA2) e *P. stratiotes* (PA3). Os subprodutos da degradação do fipronil por oxidação e redução (i.e., fipronil sulfona e fipronil sulfeto, respectivamente) foram quantificados para as amostras de água. As maiores concentrações dos agrotóxicos nos tratamentos com planta podem ser decorrentes da proteção da água superficial à luz, pois dificulta o processo de fotólise, uma relevante rota de degradação do 2,4-D e fipronil (TINGLE et al., 2003; ZEPP et al., 1975). A PA1, por exemplo, apresenta menor área superficial em relação às outras macrófitas, o que pode justificar o seu comportamento mais próximo aos tratamentos SP. Vale ressaltar que os metabólitos do 2,4-D não foram quantificados (i.e., 2,4-diclorofenol, 4-clorofenol e 2,4-dicloro-1-metoxibenzeno), assim como os subprodutos da degradação do fipronil por hidrólise e fotólise (i.e., fipronil amida e fipronil desulfenil, respectivamente).

Tabela 27 – Concentrações de agrotóxicos obtidas nas amostras de água analisadas após o experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).

Tratamento	Planta	2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fipronil ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fipronil sulfeto ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fipronil sulfona ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Controle	SP	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	PA1	<LQ	0,50	<LQ	<LQ
	PA2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	PA3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
2,4-D	SP	179,1	<LQ	<LQ	<LQ
	PA1	170,2	<LQ	<LQ	<LQ
	PA2	206,5	<LQ	<LQ	<LQ
	PA3	214,8	<LQ	<LQ	<LQ
Fipronil	SP	<LQ	36,9	<LQ	0,7
	PA1	<LQ	37,6	<LQ	0,8
	PA2	<LQ	35,5	<LQ	0,6
	PA3	<LQ	40,5	<LQ	1,2
Mistura	SP	164,9	38,2	<LQ	0,8
	PA1	165,8	39,8	<LQ	1,2
	PA2	193,2	44,9	<LQ	0,7
	PA3	195,8	44,4	<LQ	1,3

Notas:

Concentração inicial de $158,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D e $32,6 \mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil, considerando mistura 1:1.

LQ = $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para o 2,4-D, $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para o fipronil e fipronil sulfona e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o fipronil sulfeto.

As concentrações dos agrotóxicos acumulados nas amostras de parte aérea e raízes das plantas aquáticas estudadas foram apresentadas na Tabela 28. Todas as plantas apresentaram bioacumulação de fipronil, o que pode ser decorrente do caráter sistêmico desse inseticida (SIMON-DELSO et al., 2015). Ocorreu detecção de fipronil inclusive nas amostras provenientes dos tratamentos C, o que pode ter sido resultado de contaminação cruzada durante o desenvolvimento do experimento ou processamento da biomassa das plantas. Nos tratamentos F e M, a bioacumulação de fipronil foi mais evidente nas raízes em relação à parte aérea para as três plantas avaliadas, caracterizando a predominância do processo de rizoacumulação.

Tabela 28 – Concentrações dos agrotóxicos acumulados nas amostras de parte aérea (A) e raiz (R) de *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3), após o experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias.

Tratamento	Planta	Amostra	2,4-D ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fipronil ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fipronil sulfeto ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Fipronil sulfona ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Controle	PA1	A	6,5	15,0	<LQ	1,3
		R	<LQ	20,4	<LQ	3,6
	PA2	A	<LQ	2,4	<LQ	0,7
		R	<LQ	4,2	<LQ	1,7
	PA3	A	<LQ	2,0	<LQ	0,4
		R	<LQ	2,9	<LQ	1,3
2,4-D	PA1	A	105,0	4,8	<LQ	0,6
		R	29,1	10,7	<LQ	2,4
	PA2	A	80,5	1,6	<LQ	0,7
		R	37,0	1,3	<LQ	0,7
	PA3	A	64,0	2,5	<LQ	0,3
		R	63,7	2,9	<LQ	1,1
Fipronil	PA1	A	8,0	87,0	1,7	16,6
		R	<LQ	148,0	4,6	53,0
	PA2	A	<LQ	42,0	0,7	14,7
		R	<LQ	91,1	4,6	46,0
	PA3	A	<LQ	42,0	1,2	11,7
		R	<LQ	129,0	5,0	36,0
Mistura	PA1	A	104,0	81,0	1,6	18,4
		R	111,0	154,0	8,7	74,0
	PA2	A	93,0	40,0	0,8	15,1
		R	9,3	96,0	5,0	52,0
	PA3	A	60,9	75,0	1,3	12,5
		R	49,5	138,5	5,1	37,7

Notas:

Concentração inicial de 158,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D e 32,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fipronil, considerando mistura 1:1.

LQ = 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o 2,4-D e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o fipronil e seus metabólitos.

Dessa forma, os índices FBC, FBA e FT foram calculados com base nas concentrações reportadas na água e na parte aérea e raiz das plantas (Tabela 29). As três plantas foram capazes de bioconcentrar o 2,4-D, sendo que os maiores valores ocorreram com a PA3 no tratamento D (0,30) e a PA1 no tratamento M (0,67). Em relação à bioacumulação, a PA1 apresentou os maiores valores em D e M (0,79 e 1,30, respectivamente). A translocação de 2,4-D foi a maior para a PA2 no tratamento M (10,0) e as plantas apresentaram potencial de translocar e acumular esse herbicida na parte aérea (em geral, FT > 1,0). Isso pode ser explicado pela elevada

solubilidade do 2,4-D (540 mg L⁻¹ a 20 °C) (KIM et al., 2021), que pode seguir os fluxos de água dentro do sistema vegetal. O mesmo não ocorreu com fipronil, para o qual todos os valores de FT obtidos foram menores que 1,0, com exceção da PA2 (FT = 1,23), indicando que esse inseticida é acumulado predominantemente nas raízes. O fipronil pode ter apresentado maior afinidade com a matéria orgânica da biomassa das raízes (K_{OC} de 825 a 6863) (KIM et al., 2021), dificultando o processo de translocação. A maior bioconcentração e bioacumulação ocorreu para a PA1 nos tratamentos F e M, indicando que essa espécie seria a mais recomendada para a fitorremediação de águas contaminadas com os agrotóxicos estudados, especialmente o fipronil.

Tabela 29 – Fator de bioconcentração (FBC), fator de bioacumulação (FBA) e fator de translocação (FT) para os agrotóxicos acumulados nas amostras de *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3), após o experimento de fitorremediação de águas contaminadas com 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias.

Tratamento	Planta	2,4-D			Fipronil		
		FBC	FBA	FT	FBC	FBA	FT
Controle	PA1	-	-	-	40,8	70,8	0,74
	PA2	-	-	-	-	-	0,57
	PA3	-	-	-	-	-	0,69
2,4-D	PA1	0,17	0,79	3,61	-	-	0,45
	PA2	0,18	0,57	2,18	-	-	1,23
	PA3	0,30	0,59	1,00	-	-	0,86
Fipronil	PA1	-	-	-	4,01	6,25	0,59
	PA2	-	-	-	2,57	3,75	0,46
	PA3	-	-	-	3,19	4,22	0,33
Mistura	PA1	0,67	1,30	0,94	4,03	6,15	0,53
	PA2	0,05	0,53	10,00	2,14	3,03	0,42
	PA3	0,25	0,56	1,23	3,12	4,81	0,54

Dolui et al. (2021) também observaram o potencial de *Salvinia natans* L. em bioacumular o 2,4-D. Esses autores indicaram que, para concentrações iniciais de 100 e 500 µM, houve saturação das eficiências de bioacumulação do 2,4-D (75 e 63%, respectivamente) a partir de 10 e 6 h, respectivamente. Esses resultados indicam que tempos de contato menores

que aquele utilizado na presente pesquisa (i.e., 7 dias) já podem ser suficientes para que as plantas absorvam esse herbicida. Além disso, em doses subletais (até 500 μM) o 2,4-D pode estimular o crescimento e favorecer a hiperacumulação de sódio e arsênio. Essa aplicação poderia ser interessante para estratégias de fitorremediação, uma vez que ambientes aquáticos estão sujeitos a contaminações com múltiplos estressores (e.g., salinidade, metais e pesticidas) (DOLUI et al., 2022).

Estratégias de fitorremediação não estão limitadas exclusivamente à absorção dos contaminantes pelas plantas. Alonso et al. (2021) investigaram o potencial de absorção do herbicida saflufenacil pelas macrófitas aquáticas *Egeria densa* e *Pistia stratiotes*. Embora a absorção tivesse sido baixa para essas espécies, houve redução na meia-vida desse herbicida nos tratamentos com a presença de *E. densa* e *P. stratiotes* (82,6 e 94,8% após 96 e 108 h, respectivamente).

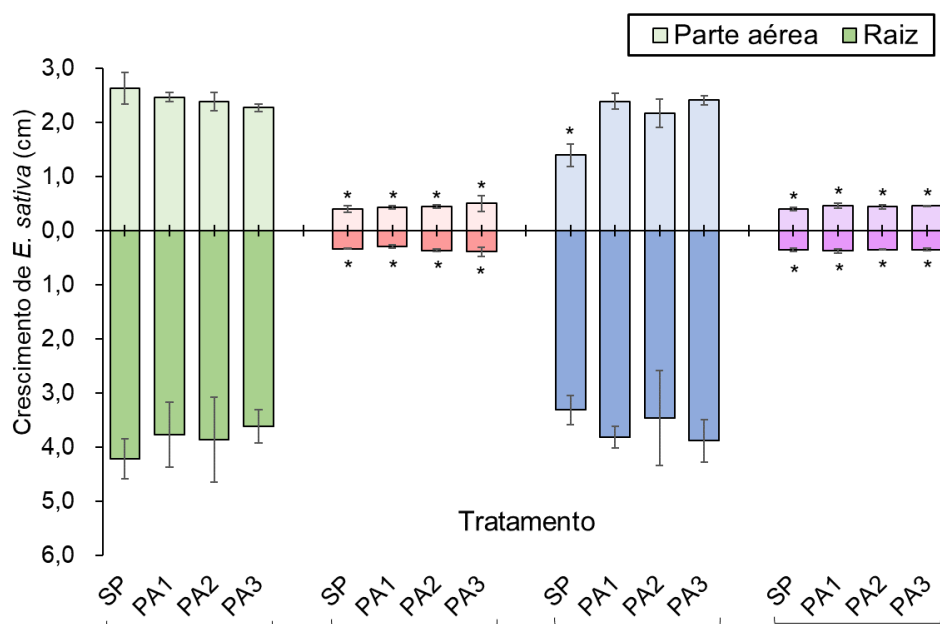
Ensaio de germinação de sementes de *E. sativa* L. foram feitos com as amostras de água após o experimento de fitorremediação utilizando as plantas PA1, PA2 e PA3 (Tabela 30). Para o *endpoint* de germinação (ANOVA, $F = 2,22$, $p > 0,05$), considerando o *post hoc* de Tukey ($p > 0,05$), não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Para o *endpoint* de crescimento de parte aérea das plântulas germinadas, os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas (ANOVA, $F = 153,03$, $p < 0,05$) (Figura 35). Pelo *post hoc* de Tukey, os tratamentos C foram similares entre si ($p > 0,05$), sendo que todos os tratamentos D e M foram diferentes do crescimento da parte aérea do controle ($p < 0,05$). Os tratamentos F também foram similares ao C ($2,6 \pm 0,3$ cm, $p > 0,05$), com exceção do F sem planta, que apresentou menor crescimento médio da parte aérea ($1,4 \pm 0,2$ cm, $p < 0,05$). Apesar desse resultado, possíveis resíduos de 2,4-D estiveram abaixo do limite de quantificação ($< 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) no tratamento F. Para o *endpoint* de raiz das plântulas germinadas, diferenças estatísticas significativas foram observadas entre os tratamentos (ANOVA, $F = 63,39$, $p < 0,05$). Pelo *post*

hoc de Tukey, os tratamentos C e F foram similares entre si ($p > 0,05$), sendo que todos os tratamentos D e M foram diferentes do crescimento da raiz em C ($4,2 \pm 0,4$ cm, $p < 0,05$). Esse comportamento de inibição do crescimento das plântulas na presença do 2,4-D é esperado, pois o mecanismo de ação do 2,4-D afeta especialmente as plantas dicotiledôneas (SONG, 2014), como a *E. sativa* L.. Além disso, foi observado que a inibição do crescimento da parte aérea e das raízes foi mais evidente para as amostras de água utilizadas em relação às amostras de elutriato (Seção 5.4)

Tabela 30 – Ensaio de ecotoxicidade para avaliação da germinação de sementes de *Eruca sativa* L. expostas às amostras de água após o experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).

Tratamento	Planta	Germinação (%)	Parte aérea (cm)	Raiz (cm)
Controle	SP	$86,7 \pm 11,5$	$2,6 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,4$
	PA1	$93,3 \pm 5,8$	$2,5 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,6$
	PA2	$76,7 \pm 11,5$	$2,4 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,8$
	PA3	$86,7 \pm 5,8$	$2,3 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,3$
2,4-D	SP	$76,7 \pm 11,5$	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,0$
	PA1	$73,3 \pm 11,5$	$0,4 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,0$
	PA2	$70,0 \pm 10,0$	$0,4 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,0$
	PA3	$80,0 \pm 10,0$	$0,5 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$
Fipronil	SP	$86,7 \pm 11,5$	$1,4 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,3$
	PA1	$80,0 \pm 10,0$	$2,4 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,2$
	PA2	$93,3 \pm 5,8$	$2,2 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,9$
	PA3	$90,0 \pm 10,0$	$2,4 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,4$
Mistura	SP	$90,0 \pm 10,0$	$0,4 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,0$
	PA1	$86,7 \pm 5,8$	$0,5 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,0$
	PA2	$70,0 \pm 10,0$	$0,4 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,0$
	PA3	$66,7 \pm 15,3$	$0,5 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,0$

Figura 35 – Ensaio de ecotoxicidade para avaliação da germinação de sementes de *Eruca sativa* L. expostas às amostras de água após o experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, com duração de 7 dias, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).



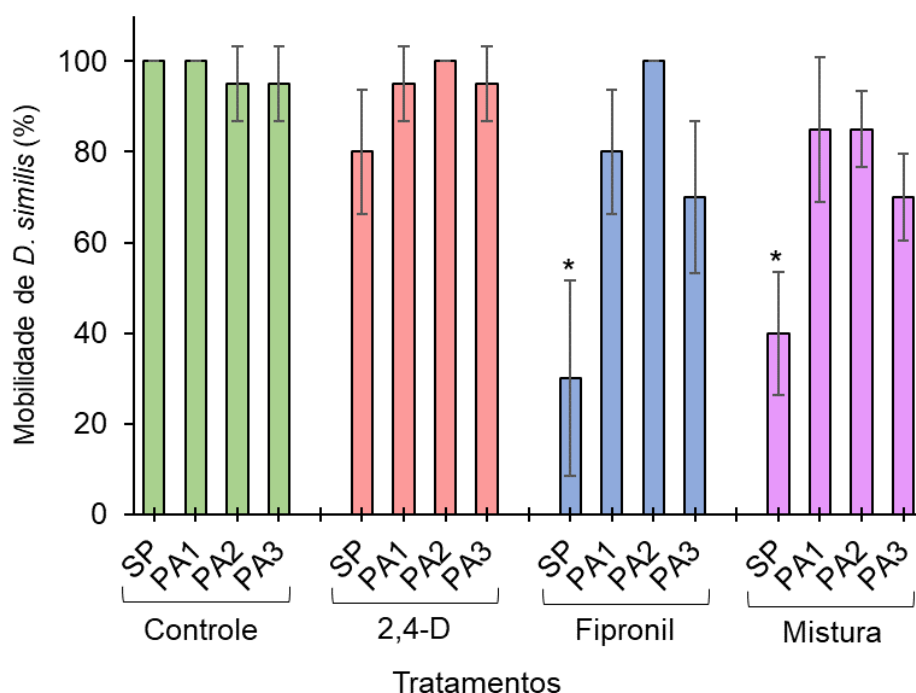
Nota:

Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle C ($p < 0,05$) identificadas com um asterisco (*), conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

Da mesma forma, outros estudos utilizaram testes de germinação com *E. sativa* L. como bioindicadores de 2,4-D e fipronil. No estudo de Ogura et al. (2022), a espécie apresentou maior sensibilidade ao 2,4-D em relação ao fipronil e à vinhaça de cana-de-açúcar. O fipronil não apresentou fitotoxicidade em amostras de água coletadas em experimentos de mesocosmos até a máxima concentração detectada de $42,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, as concentrações de 2,4-D (variando de $303,6$ a $1384,8 \mu\text{g L}^{-1}$) inibiram completamente o crescimento da parte aérea e da raiz de *E. sativa* L. nesse estudo. Freitas et al. (2022a) indicaram inibição do crescimento de *E. sativa* L. quando expostas à água com concentrações ainda menores de 2,4-D (de $8,5$ a $16,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Os resultados desses estudos sugerem que irrigar culturas com resíduos de 2,4-D, dentro das concentrações testadas, pode causar fitotoxicidade e reduzir a produtividade da biomassa.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda consideraram a mobilidade (%) dos organismos de *D. similis* expostos, por 48 h, às amostras de água do experimento de fitorremediação com as plantas PA1, PA2 e PA3 (Figura 36). Os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si (ANOVA, $F = 10,05$, $p < 0,05$). Porém, considerando o *post hoc* de Tukey, apenas os tratamentos F e M não foram similares ao controle ($p < 0,05$). Na literatura, não foram encontrados valores de concentração de efeito para *D. similis*. Por outro lado, as concentrações reportadas nos tratamentos com fipronil ($35,5$ a $44,9 \mu\text{g L}^{-1}$) poderiam causar efeitos significativos em *Daphnia pulex*, uma vez que a CE_{50} para essa espécie variou entre $15,6$ e $40,39 \mu\text{g L}^{-1}$ (STARK e VARGAS, 2005). Nesse estudo, a espécie *Daphnia magna* também apresentou sensibilidade quando exposta ao fipronil ($CE_{50} = 88,3 \mu\text{g L}^{-1}$), mas com concentrações de efeito maiores do que aquelas reportadas nos tratamentos. Outro estudo reportou valores de CE_{50} entre 70 e $380 \mu\text{g L}^{-1}$ (PINO-OTÍN et al., 2021), valores que também estão acima dos reportados na presente pesquisa.

Figura 36 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Daphnia similis* expostos às amostras de água do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).



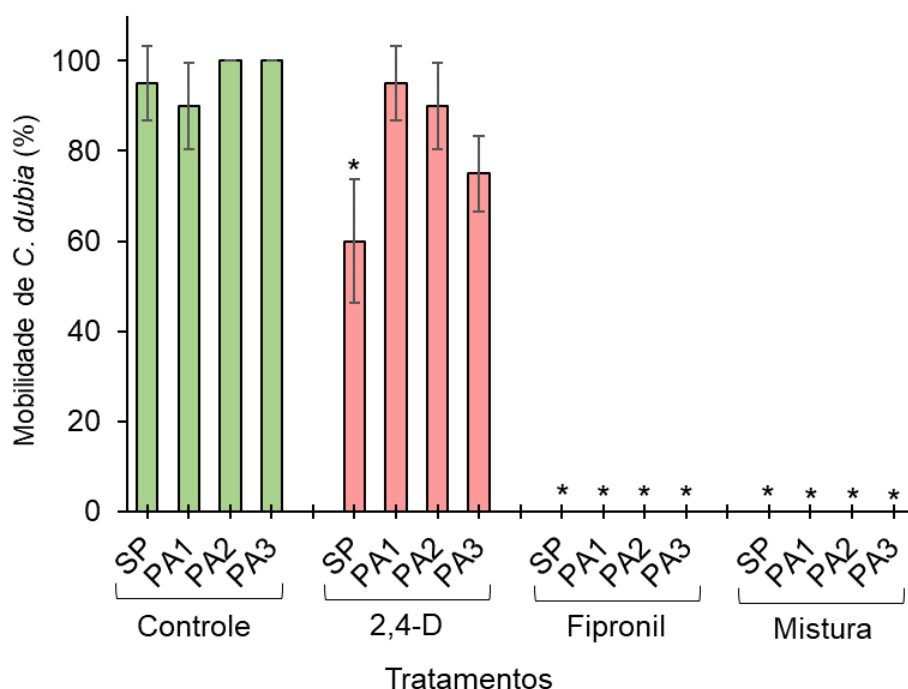
Nota:

Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle C ($p < 0,05$) identificadas com um asterisco (*), conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda com *C. dubia* avaliaram a mobilidade (%) dos organismos expostos, por 48 h, às amostras de água do experimento de fitorremediação com as macrófitas PA1, PA2 e PA3 (Figura 37). Os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si (ANOVA, $F = 165,94$, $p < 0,05$). Considerando o *post hoc* de Tukey, os tratamentos F e M não foram similares ao controle ($p < 0,05$). Apesar dos tratamentos D com as plantas aquáticas terem apresentado similaridade em relação ao controle ($95,5 \pm 8,3\%$, *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$), o tratamento sem planta ($60,0 \pm 13,6\%$) apresentou diferenças estatísticas significativas tanto em relação ao controle, quanto em relação aos demais tratamentos D com planta (*post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). A espécie *C. dubia* foi mais sensível ao fipronil em comparação com a *D. similis*. Da mesma forma, Hayasaka et al. (2012) reportaram concentrações de efeito significativamente menores para *C. dubia* e *Ceriodaphnia*

reticulata ($CE_{50} = 0,99$ e $8,83 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) em comparação com *Daphnia magna* e *D. pulex* ($CE_{50} = 88,30$ e $40,39 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente).

Figura 37 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Ceriodaphnia dubia* expostos às amostras de água do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando os tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).



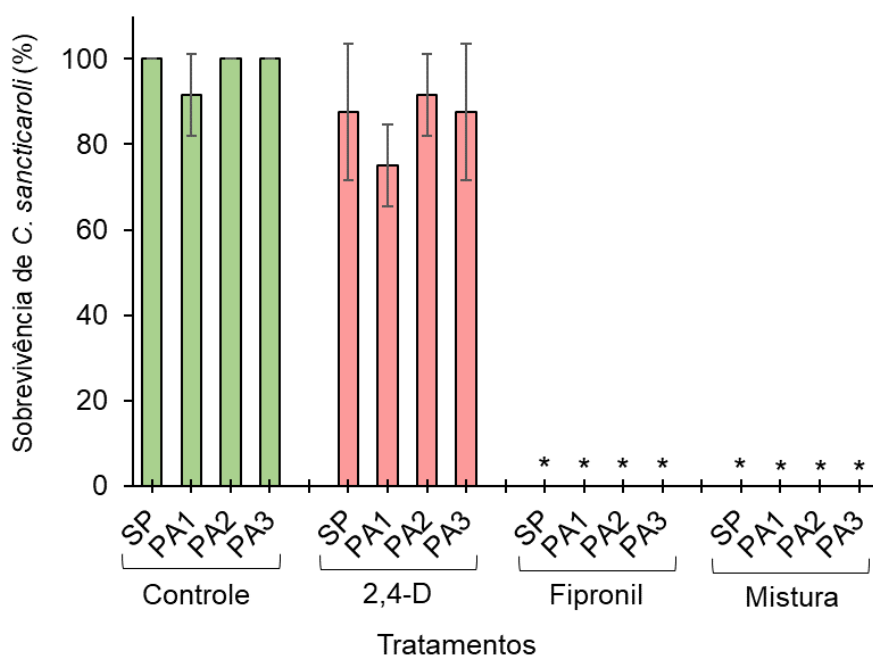
Nota:

Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle C ($p < 0,05$) identificadas com um asterisco (*), conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda com *C. sancticaroli* consideraram a sobrevivência (%) das larvas expostas, por 96 h, às amostras de água do experimento de fitorremediação com as plantas PA1, PA2 e PA3 (Figura 38). Os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si (ANOVA, $F = 185,04$, $p < 0,05$), em especial os tratamentos F e M (*post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). Efeitos letais não eram esperados nos tratamentos D, uma vez que concentrações de até $426,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D não causaram letalidade às larvas expostas em estudos anteriores, mesmo após 8 dias de exposição (PINTO et al., 2021b). Essa concentração

está acima daquelas detectadas na presente pesquisa nos tratamentos D com e sem plantas (de 170,2 a 214,8 $\mu\text{g L}^{-1}$). Por outro lado, o estudo de Pinto et al. (2021) obteve efeitos letais com diferenças estatísticas para concentrações acima de 0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($\text{CE}_{50} = 3,7 \mu\text{g L}^{-1}$), concentração de fipronil significativamente menor do que as detectadas nos tratamentos F (de 35,5 a 40,5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Essas observações são análogas aos experimentos em mistura (2,4-D de 164,9 a 195,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e fipronil de 38,2 a 44,9 $\mu\text{g L}^{-1}$), justificando que o fipronil foi o principal responsável pela toxicidade às larvas de *C. sancticaroli* expostas às amostras.

Figura 38 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (96 h) com larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas às amostras de água do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).



Nota:

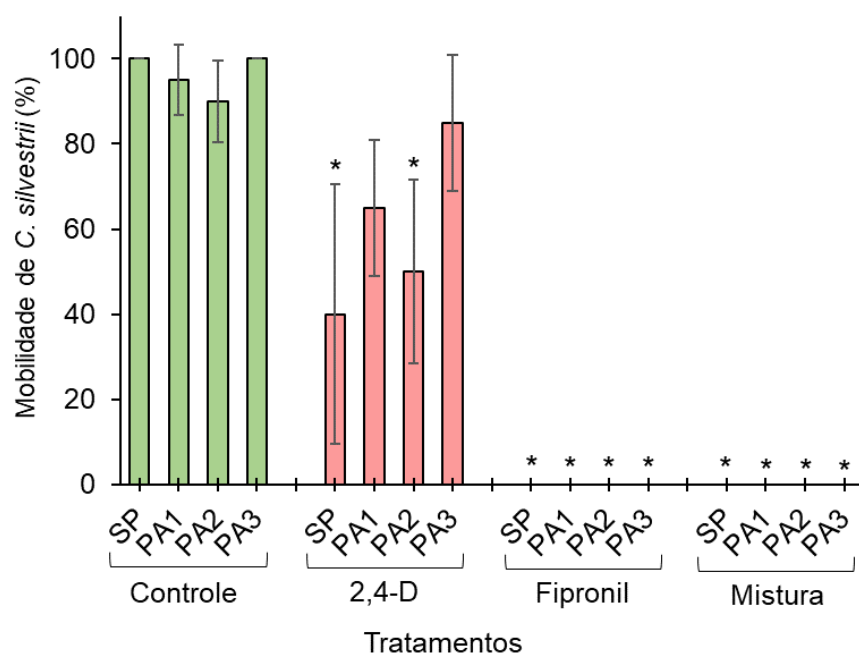
Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle C ($p < 0,05$) identificadas com um asterisco (*), conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

A sensibilidade dos quironomídeos ao fipronil também foi identificada para outras espécies, como a *C. dilutus* no estudo de Weston e Lydy (2014). Os autores avaliaram 14 espécies de macroinvertebrados bentônicos e indicaram que *C. dilutus* foi a mais sensível

quando exposta, em ensaios de ecotoxicidade aguda (96 h), ao fipronil ($CE_{50} = 1593 \text{ ng L}^{-1}$) e aos subprodutos fipronil sulfona e fipronil sulfeto ($CE_{50} = 748$ e 1356 ng L^{-1} , respectivamente), que foram quantificados na presente pesquisa. Além disso, esses autores identificaram efeitos subletais (i.e., capacidade de reação a estímulos) para *C. dilutus* quando expostos ao fipronil, ao fipronil sulfona e fipronil sulfeto ($CE_{50} = 729$, 271 e 540 ng L^{-1} , respectivamente). Essas concentrações foram significativamente inferiores às reportadas na presente pesquisa nos tratamentos F (entre $35,5$ e $40,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), indicando riscos de letalidade e efeitos subletais aos organismos potencialmente expostos. Além disso, as concentrações de fipronil sulfona detectadas nos tratamentos F (de $14,7$ a $53,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e M (de $12,5$ a $74,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) podem reforçar a ocorrência dos efeitos de toxicidade aos quironomídeos expostos.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda com *C. silvestrii* avaliaram a mobilidade (%) dos organismos expostos, por 48 h, às amostras de água do experimento de fitorremediação com as plantas PA1, PA2 e PA3 (Figura 39). Os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si (ANOVA, $F = 40,64$, $p < 0,05$). Considerando o *post hoc* de Tukey, todos os tratamentos F e M foram diferentes do controle ($p < 0,05$), nos quais não houve mobilidade dos organismos expostos. Os tratamentos D sem planta ($40,0 \pm 30,4\%$) e com a PA2 ($50,0 \pm 21,5\%$) apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle ($100,0 \pm 0,0\%$, *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). Os efeitos de imobilidade observados nos tratamentos F e M são decorrentes das concentrações de fipronil detectadas nos experimentos (de $35,5$ a $44,9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), uma vez que o valor de CE_{50} para *C. silvestrii* ($3,9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) é cerca de dez vezes menor (SILVA et al., 2020). Por outro lado, as concentrações de 2,4-D nos experimentos ($170,2$ a $214,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) estiveram próximas do valor de CE_{50} para *C. silvestrii* ($169,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) (SILVA et al., 2020).

Figura 39 – Ensaios de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos às amostras de água do experimento de fitorremediação de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, considerando tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).



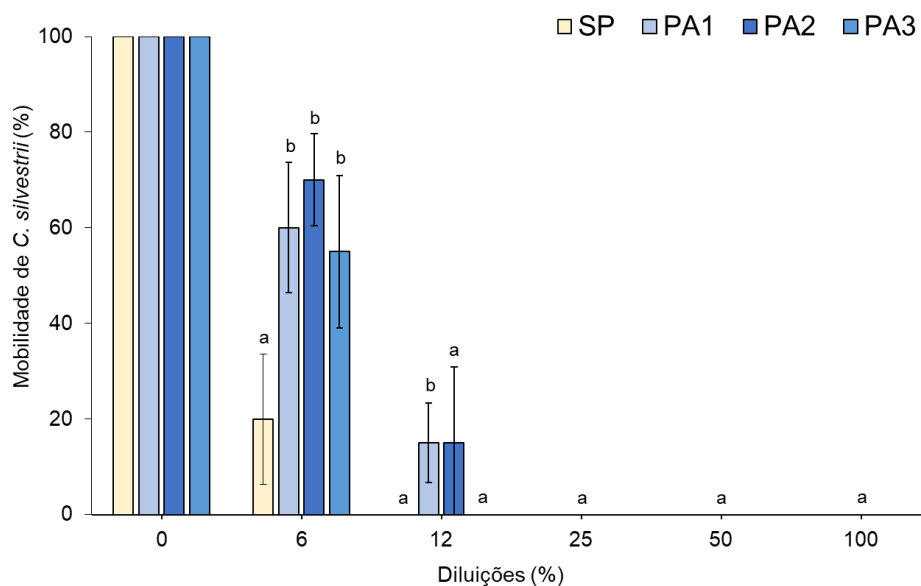
Nota:

Diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle C ($p < 0,05$) identificadas com um asterisco (*), conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey.

Ensaios de ecotoxicidade aguda com *C. silvestrii* foram feitos com as amostras provenientes dos tratamentos F e M. Considerando as amostras dos tratamentos F (Figura 40), todas as diluições testadas (6, 12, 25, 50 e 100%) apresentaram mobilidade inferior ao controle (diluição de 0%) ($p < 0,05$). No tratamento SP, apenas houve mobilidade na diluição de 6%, na qual os tratamentos com as três plantas apresentaram valores superiores ($p < 0,05$). Para a diluição de 12%, organismos móveis foram encontrados apenas nas amostras provenientes das plantas PA1 e PA2, sendo que apenas a PA1 foi estatisticamente diferente do tratamento SP. Para as amostras dos tratamentos M (Figura 41), a mobilidade dos organismos expostos foi relativamente maior em relação aos tratamentos F. Houve mobilidade para as plantas PA2 e PA3 nas diluições de 6, 12 e 25%, enquanto a PA1 apresentou mobilidade nas diluições de 6 e 12%. Para o tratamento SP, os valores médios de mobilidade foram menores que os resultados

das três plantas nas diluições 6 e 12% ($p < 0,05$). De acordo com os resultados de quantificação química (Tabela 27), as concentrações de fipronil em F e M estiveram entre 35,5 e 44,9 $\mu\text{g L}^{-1}$. Dessa forma, estima-se que as diluições de 6, 12, 25 e 50% corresponderiam a valores entre 2,1 e 2,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, 4,2 e 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, 8,8 e 11,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 17,7 e 22,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Conforme SILVA et al. (2020), essas concentrações já seriam suficientes para causar efeitos nos neonatos de *C. silvestrii* expostos ($\text{CE}_{10} = 2,1 \mu\text{g L}^{-1}$, $\text{CE}_{20} = 2,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e $\text{CE}_{50} = 3,9 \mu\text{g L}^{-1}$). Nesse caso, apenas a diluição de 6% apresentaria valores próximos à CE_{10} e CE_{20} , o que pode justificar a sobrevivência dos organismos nessa diluição para todos os tratamentos.

Figura 40 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos às diferentes diluições das amostras de água do experimento de fitorremediação de fipronil, considerando tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).



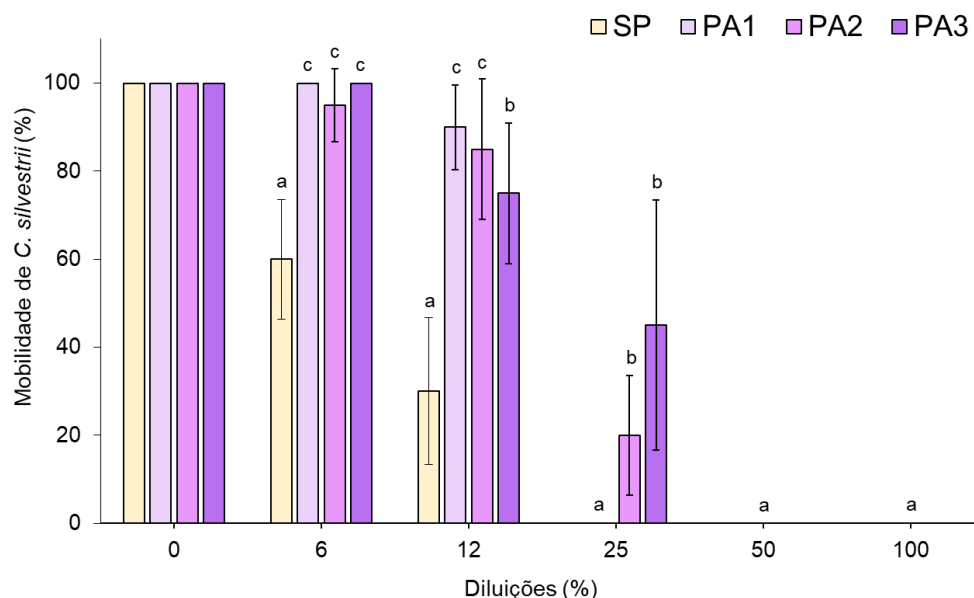
Notas:

Diferenças estatísticas conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey (considerando $p < 0,05$).

a = diferenças estatísticas significativas em relação ao controle de laboratório (i.e., diluição de 0%)

b = diferenças estatísticas significativas em relação ao controle de laboratório e ao tratamento SP

Figura 41 – Ensaio de ecotoxicidade aguda (48 h) com neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos às diferentes diluições das amostras de água do experimento de fitorremediação das misturas de fipronil e 2,4-D, considerando tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).



Notas:

Diferenças estatísticas conforme resultados da ANOVA seguida de *post hoc* de Tukey (considerando $p < 0,05$).

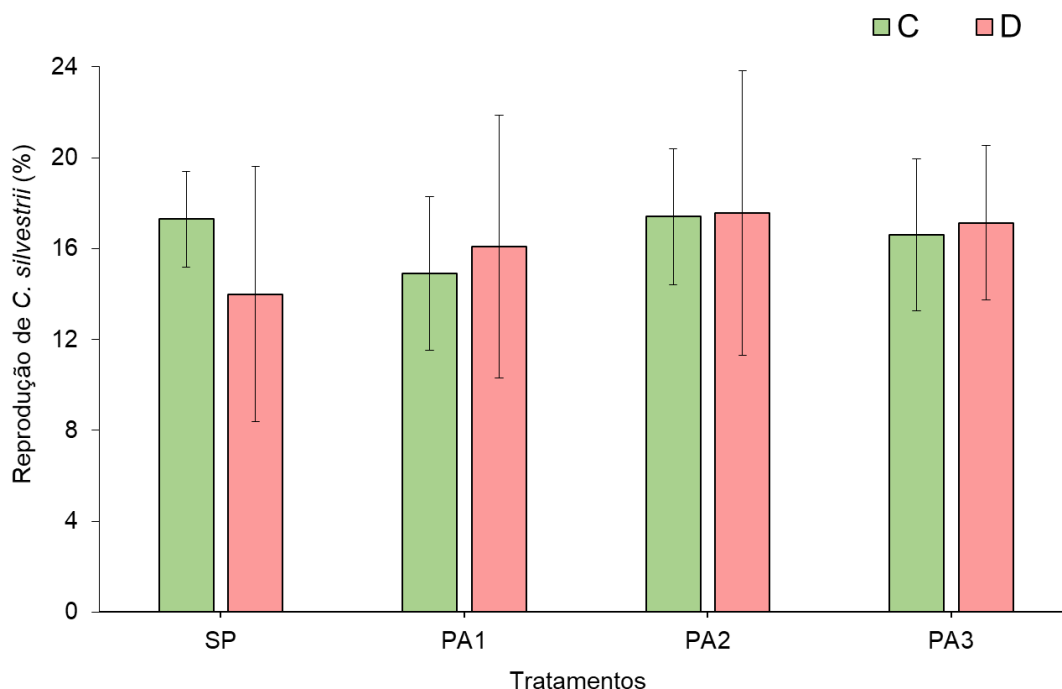
a = diferenças estatísticas significativas em relação ao controle de laboratório (i.e., diluição de 0%)

b = diferenças estatísticas significativas em relação ao controle de laboratório e ao tratamento SP

c = diferenças estatísticas significativas em relação ao tratamento SP

Ensaio de ecotoxicidade crônica foram feitos, considerando 8 dias de exposição, com os tratamentos C e D, nos quais não foram identificadas diferenças estatísticas significativas (Figura 42). Para os tratamentos com as plantas aquáticas, os valores foram similares entre os tratamentos C e D, sendo que não foram identificadas diferenças estatísticas entre as plantas. O mesmo ocorreu para o tratamento sem plantas ($p > 0,05$), apesar do valor médio de reprodução em D (14 ± 6) ter sido inferior ao C (17 ± 2). Ademais, o desvio-padrão das amostras provenientes dos tratamentos D foi superior aos desvios do tratamento C. De acordo com o trabalho de Silva et al. (2020), apenas concentrações de 2,4-D acima de 43 mg L^{-1} causariam efeitos na reprodução de *C. silvestrii* ($CE_{10} = 43 \text{ mg L}^{-1}$, $CE_{20} = 47 \text{ mg L}^{-1}$ e $CE_{50} = 55 \text{ mg L}^{-1}$). Essas concentrações são cerca de 200 vezes superiores às concentrações detectadas nos experimentos da presente pesquisa ($0,17$ a $0,21 \text{ mg L}^{-1}$) e, portanto, não são esperados efeitos na reprodução decorrentes do 2,4-D.

Figura 42 – Ensaios de ecotoxicidade crônica (8 dias) com neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos às diferentes diluições das amostras de água do experimento de fitorremediação controle e com 2,4-D, considerando tratamentos sem planta (SP) e com *Salvinia auriculata* (PA1), *Eichhornia crassipes* (PA2) e *Pistia stratiotes* (PA3).



As plantas aquáticas utilizadas não foram capazes de reduzir as concentrações dos agrotóxicos nas amostras de água e, portanto, a sub-hipótese 2 da presente pesquisa não foi aceita. Além disso, a PA1 apresentou os maiores efeitos de fitotoxicidade quando exposta às diferentes concentrações de 2,4-D e, mesmo assim, foi capaz de efetuar a acumulação de fipronil em concentrações superiores às demais espécies. A concentração de 2,4-D testada no experimento de fitorremediação ($158,2 \mu\text{g L}^{-1}$) foi menor que as duas maiores concentrações dos ensaios de fitotoxicidade ($222,7$ e $445,4 \mu\text{g L}^{-1}$), nas quais foram identificados os efeitos mais acentuados às plantas avaliadas (conforme resultados da Seção 6.3).

Em geral, as amostras de água não tiveram redução das concentrações dos agrotóxicos em comparação com o tratamento SP e, portanto, a sub-hipótese 3 não foi aceita. Além disso, não houve significativa redução da ecotoxicidade aos organismos bioindicadores utilizados. Efeitos de inibição do crescimento foram evidentes nos ensaios de germinação com *E. sativa*

L., atribuídos em especial aos resíduos de 2,4-D presentes nas amostras. Resíduos de fipronil ocasionaram imobilidade dos cladóceros *C. dubia*, *C. silvestrii* e *D. similis*, além de letalidade do inseto *C. sancticaroli*. Em ensaios de ecotoxicidade crônica (8 dias), as amostras com resíduos de 2,4-D não ocasionaram efeitos significativos de redução da reprodução em relação ao tratamento C. Entretanto, os efeitos de imobilidade foram evidenciados nos tratamentos F e M mesmo quando as amostras foram diluídas de 6 a 25%.

A sub-hipótese 4 foi respondida para o fipronil e o 2,4-D, uma vez que todas as plantas foram capazes de bioacumular os agrotóxicos nos tratamentos de forma isolada e em mistura. A bioacumulação de fipronil ocorreu principalmente nas raízes das plantas utilizadas ($FT < 1,0$), da mesma forma que foi observado para as plantas terrestres (Seção 6.4). Além disso, as plantas foram consideradas hiperacumuladoras de fipronil, mesmo avaliando apenas os agrotóxicos acumulados nas raízes ($FBC > 1,0$). Por outro lado, 2,4-D foi bioacumulado, na maioria dos casos, na parte aérea das plantas avaliadas. As plantas não foram consideradas hiperacumuladoras de 2,4-D, uma vez que os valores de FBC e FBA foram menores que 1,0.

6.6. Aplicabilidade da fitorremediação no contexto da cana-de-açúcar

As implicações ecológicas dos contaminantes do cultivo e processamento da cana-de-açúcar ainda precisam de maior compreensão. Embora as diretrizes brasileiras estabeleçam limites para alguns agrotóxicos em água doce (BRASIL, 2005), a maioria das concentrações são consideravelmente mais altas do que em outros países. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente [CONAMA] estabeleceu o limite para concentração de 2,4-D na água doce até $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$, embora os usos mais restritivos tenham concentrações abaixo de $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$, incluindo irrigação (BRASIL, 2005). No entanto, a União Europeia permite a maioria dos agrotóxicos em água até $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (EC, 1998), 12 e 300 vezes mais restritivos do que os atuais parâmetros brasileiros de potabilidade para fipronil e 2,4-D, respectivamente (BRASIL, 2021). Da mesma forma, os limites das diretrizes da Austrália para fipronil e 2,4-D na água potável são $0,7$ e $30 \mu\text{g L}^{-1}$ (NHMRC, 2011), e este último é semelhante à Organização Mundial da Saúde [OMS] (WHO, 2011). Enquanto isso, a Agência Ambiental dos Estados Unidos [USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*] permite concentrações de 2,4-D de até $70,0 \mu\text{g L}^{-1}$ na água potável (USEPA, 2018). No entanto, a OMS e a USEPA não possuem o valor da diretriz do fipronil. A soma de todos os agrotóxicos quantificados em água na Europa deve atender a concentração máxima de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (EC, 1998).

Essas contaminações podem comprometer a produtividade agrícola, pois a irrigação com esse herbicida pode inibir o desenvolvimento das lavouras (FREITAS et al., 2022a; OGURA et al., 2022a). Portanto, é crucial realizar avaliações de saúde humana e de risco ecológico nesse cenário e atualizar essas diretrizes. Além disso, apesar de vários avanços nos estudos ecotoxicológicos com espécies de ambientes temperados, ainda existem lacunas de informações sobre espécies nativas neotropicais (DAAM et al., 2019).

O atual Código Florestal (Brasil, 2012) apresenta diversos desafios em relação à sustentabilidade em áreas agrícolas. A fiscalização pode contribuir para a redução das emissões

de GEE por meio do controle do desmatamento ilegal (SOTERRONI et al., 2018). No entanto, o desmatamento ainda ameaça a biodiversidade brasileira e os serviços ecossistêmicos (VIEIRA et al., 2018). Portanto, as partes interessadas devem se engajar no debate para melhorar o BFC em direção à sustentabilidade e contestar o desmantelamento das leis ambientais brasileiras (ABESSA et al., 2019). Além disso, alternativas de revegetação podem incluir corredores ecológicos que conectam fragmentos florestais separados por lavouras de cana-de-açúcar, reduzindo assim os riscos à biodiversidade. Estratégias de manejo do solo mantêm os serviços ecossistêmicos, como os sistemas agroflorestais (POWLSON et al., 2011; STAVI e LAL, 2013) e práticas de rotação de culturas que promovem a recuperação do solo durante os períodos entressafra (GŁODOWSKA e WOZNIAK, 2019; PARTEY et al., 2016).

No contexto de produção de cana-de-açúcar, a fitorremediação pode ser aplicada durante o período entressafra. No estado de São Paulo, esse período corresponde aos meses de verão, que apresentam índices pluviométricos adequados. Assim, estima-se que não seja necessário que ocorra irrigação das plantas durante a aplicação da fitorremediação, o que se apresentaria como uma vantagem para essa técnica. Diante dos resultados das Seções 6.4 e 6.5, os ensaios de fitorremediação não apresentaram eficiências satisfatórias, o que pode ser justificado pelo curto tempo de contato das plantas com as amostras contaminadas. Entretanto, o potencial de bioacumulação dos agrotóxicos foi observado para plantas terrestres e aquáticas, o que indica que essa absorção ainda pode ser melhorada ao encontrar as condições ideais de tratamento (e.g., alteração do pH, variação da luminosidade e aumento de nutrientes). Vale ressaltar que os ensaios foram desenvolvidos em laboratório e que as condições de fitorremediação em escala real podem ser diferentes. Portanto, mais estudos são necessários para viabilizar essa prática em campo.

Para águas contaminadas com os agrotóxicos, as plantas aquáticas podem ser aplicadas de duas maneiras. Uma bacia de contenção pode ser construída de modo a receber a água do

escoamento superficial proveniente do cultivo de cana-de-açúcar. Assim o tratamento da fitorremediação poderia ser desenvolvido em um sistema de *wetlands*. Por outro lado, para águas superficiais contaminadas, como rios e reservatórios, a fitorremediação deve ser aplicada com cautela, uma vez que há risco de proliferação desordenada dessas plantas. Nesse contexto, destaca-se que a ocorrência de proliferação de macrófitas aquáticas em ambientes eutrofizados é esperado, de acordo com a disponibilidade de nutrientes (OGURA et al., 2022c). Caso as plantas sejam capazes de degradar os agrotóxicos, elas podem ser utilizadas para a adubação orgânica do próprio cultivo de cana-de-açúcar. Porém, a biomassa vegetal também pode ser uma fonte indireta de contaminação por agrotóxicos. Em especial, caso ocorra bioacumulação dos agrotóxicos na biomassa vegetal, pode ocorrer a biomagnificação do contaminante na cadeia trófica.

Outra limitação da fitorremediação é a necessidade de remoção das espécies vegetais utilizadas, além da destinação final desses resíduos, que muitas vezes passam por pirólise (GONG et al., 2018). Esse processo é comumente utilizado para a produção de biocarvão (i.e., biochar), que pode ser aplicado para o melhoramento do solo ou aumento da capacidade de sorção de contaminantes (OGURA et al., 2021). Além disso, o biocarvão pode ser produzido por meio de diferentes resíduos agrícolas (e.g., folhas, caules e cascas), o que favorece a economia circular, e já existe evidência da potencial sorção de pesticidas e redução da ecotoxicidade em águas e solos contaminados (LIMA et al., 2022).

Por outro lado, a biomassa das plantas pode ser utilizada na produção de biogás (PETERSSON et al., 2007; ADENIRAN e ONOTHOJA, 2017; FERNANDES et al., 2018). Palma et al. (2017) destacaram o uso de biofilmes de microalgas para remediação de águas contaminadas por metais e a aplicabilidade na geração de biogás. A associação da fitorremediação com a produção de energia pode caracterizar um processo sustentável, além do adequado gerenciamento dos resíduos (PANDEY et al., 2016). Pantawong et al. (2015)

concluíram que *P. stratiotes* (alface d'água) é viável para a produção de biogás após ser utilizada na fitorremediação de vinhaça, um subproduto da destilação do etanol de cana-de-açúcar.

Outra alternativa para a destinação final dos resíduos da fitorremediação é a incorporação da biomassa gerada em tijolos adobe, que consistem na adição de biomassa em solos ricos em argila e apresentam consistência plástica, sendo considerados materiais de construção de baixo impacto ambiental (CALATAN et al., 2016; CHRISTOFOROU et al., 2016). Por exemplo, Faria (2002) estudou o processo de incorporação da biomassa de *Brachiaria arrecta*, *Eichhornia crassipes* e *Pistia stratiotes* em tijolos adobe e indicou a viabilidade dessa aplicação, por meio de avaliação mecânica.

O manejo das áreas de cultivo de cana-de-açúcar deve priorizar a manutenção dos serviços ecossistêmicos que contribuem para a produtividade (POWER, 2010), pois a intervenção humana pode comprometer os recursos dessas áreas. Por exemplo, o manejo inadequado do solo pós-colheita pode interferir nos processos de ciclagem de nutrientes, considerados serviços de suporte (BONINI DA LUZ et al., 2020), e avanços nas áreas de preservação permanente podem comprometer os serviços regulatórios, incluindo fluxos de água, prevenção de erosão, regulação climática, polinização, entre outros (CHERUBIN et al., 2021). Consequentemente, os serviços de abastecimento, incluindo o abastecimento de água e alimentação e serviços culturais, podem ser afetados, uma vez que as monoculturas impactam o meio ambiente e a biodiversidade, que são essenciais para os aspectos paisagísticos, turísticos e educacionais (RODRIGUES et al., 2021).

7. CONCLUSÕES

A presente pesquisa avaliou e discutiu os principais efeitos na interferência do crescimento inicial de parte aérea, raiz e biomassa de plantas terrestres e aquáticas. Dentre os agrotóxicos estudados, o 2,4-D apresentou maior fitotoxicidade para as espécies de plantas terrestres e aquáticas estudadas, afetando mais as raízes do que os demais *endpoints*. Mesmo em baixas concentrações, ocorreu inibição do crescimento das plantas quando expostas ao herbicida, o que pode indicar eventuais riscos para diversas culturas vegetais potencialmente expostas. Por outro lado, o fipronil não apresentou efeitos de fitotoxicidade, bem como a mistura desses contaminantes não apresentou sinergismo para as espécies estudadas. Entretanto, vale ressaltar que resíduos desse agrotóxico podem ser tóxicos para diferentes organismos presentes no solo e na água e, portanto, deve ser remediado.

Nesse contexto, a fitorremediação pode contribuir como uma estratégia de recuperação de solos contaminados, atuando na absorção dos contaminantes no solo e diminuindo as possíveis rotas dos contaminantes para atingir os recursos hídricos por lixiviação e escoamento superficial. Entretanto, baixas eficiências de redução das concentrações de agrotóxicos foram observadas nos experimentos, o que pode ser justificado pelo baixo tempo de contato, pelas condições experimentais ou até mesmo pelas espécies selecionadas. As concentrações residuais de agrotóxicos ainda foram capazes de causar efeitos aos organismos bioindicadores utilizado. Em particular, os efeitos do 2,4-D foram mais evidentes no teste de germinação com *E. sativa* L., enquanto o fipronil causou maiores efeitos nas demais espécies testadas. Na presente pesquisa, não foram encontradas evidências de sinergismo ou antagonismo dos agrotóxicos em mistura tanto para as plantas estudadas quanto para os organismos bioindicadores, apesar de já haver evidências na literatura que indiquem potencial interação entre fipronil e 2,4-D.

As plantas foram capazes de absorver e bioacumular os agrotóxicos, em especial o fipronil, o que indica potencial rota de remediação desse inseticida em águas e solos

contaminados e contribui para o entendimento das rotas dos agrotóxicos no ambiente. Uma vez que o agrotóxico está incorporado na biomassa das plantas, ele pode entrar em contato com a biota, especialmente os herbívoros, e causar efeitos pela ingestão ou contato. Dessa forma, é fundamental que medidas de fitorremediação de áreas contaminadas sejam acompanhadas de estratégias de gerenciamento dos resíduos gerados. A biomassa, portanto, pode ser direcionada para a produção de tijolo adobe ou utilizada para a produção de biogás.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados e das conclusões apresentadas, considerando as principais limitações da presente pesquisa, destaca-se que alguns pontos podem ser abordados em futuros trabalhos sobre fitotoxicidade e fitorremediação dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, dentre eles:

- i) **Avaliação de *endpoints* subletais:** na presente pesquisa, as análises estiveram limitadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas (i.e., considerando a germinação, crescimento da parte aérea e da raiz, além das biomassas fresca e seca), com destaque para a bioacumulação dos agrotóxicos estudados. Porém, outros *endpoints* podem ser avaliados em futuras pesquisas, incluindo análises de histologia, biomarcadores e genotoxicidade;
- ii) **Período de exposição:** Períodos maiores de exposição podem ser avaliados, conforme a persistência dos agrotóxicos (e.g., tempo de meia vida), em especial com o intuito de investigar possíveis efeitos geracionais no desenvolvimento e reprodução das plantas terrestres e aquáticas. Além disso, para os ensaios de fitorremediação, as eficiências podem ser maiores com o aumento do tempo de contato das plantas com as águas e solos contaminados;
- iii) **Escalabilidade dos experimentos:** diante do potencial de bioacumulação identificado pelos ensaios laboratoriais e pelos experimentos em microescala, outros trabalhos podem avaliar a aplicabilidade desse processo em escala real em áreas experimentais. Esse processo poderia ser feito em uma área de cana-de-açúcar no período entressafra ou, como alternativa, em microcosmos ou mesocosmos com características semi-campo;
- iv) **Combinação de espécies de plantas:** apesar de terem sido obtidos resultados para a bioacumulação dos contaminantes de forma isolada e em mistura pelas plantas

estudadas, uma possível combinação de plantas poderia aumentar o potencial de remoção dos contaminantes da água e do solo;

- v) **Otimização do potencial de bioacumulação:** a absorção dos contaminantes pelas plantas pode ser avaliada de modo a encontrar as melhores condições experimentais. Por exemplo, o aumento das condições nutricionais do meio (e.g., nitrogênio e fósforo), alteração do pH (e.g., alcalinização do solo), aumento da temperatura e alteração da luminosidade;
- vi) **Estudos multi-espécie:** podem ser desenvolvidos visando à compreensão dos efeitos subletais a outras espécies de fauna associada durante o período de fitorremediação. Por exemplo, o fipronil não causou efeitos tóxicos para as plantas terrestres e aquáticas avaliadas, mas pode contribuir com a alteração da microbiota do solo, além da fauna associada. Dessa forma, modelos como microcosmos podem contribuir para a investigação de efeitos em diferentes espécies em um sistema integrado;
- vii) **Combinação de técnicas de remediação:** a fitorremediação pode ser associada a outras técnicas de remediação de áreas degradadas para aumentar a eficiência. Nesse caso, recomenda-se que as técnicas possam apresentar sinergismo com o crescimento das plantas. Por exemplo, o biocarvão pode ser aplicado para melhoria do solo ou sorção dos contaminantes na fase aquosa;
- viii) **Destinação dos resíduos da fitorremediação:** uma das limitações da presente pesquisa foi providenciar destino adequado para as plantas utilizadas. Nesse contexto, futuras pesquisas podem investigar a incorporação da biomassa em tijolos adobe para construção ou a sua utilização na produção de energia;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D.; FAMÁ, A.; BURUAEM, L. The systematic dismantling of Brazilian environmental laws risks losses on all fronts. **Nature Ecology & Evolution** 2019 3:4, v. 3, n. 4, p. 510–511, 18 mar. 2019.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Peneiras para ensaio com telas de tecido metálico. NBR 5734.**, 1980.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). NBR12713**, 2016.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). NBR13373**.Rio de Janeiro, 2017.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). NBR12648**.Rio de Janeiro, 2018.

ACAYABA, R. D. et al. Occurrence of pesticides in waters from the largest sugar cane plantation region in the world. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–12, 6 nov. 2020.

ADENIRAN, A. E.; ONOHOJA, U. B. The potentials of production of biogas from constructed wetland macrophytes. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 33, p. 1724–1732, 2017.

AGATHOKLEOUS, E.; CALABRESE, E. J. Hormesis: The dose response for the 21st century: The future has arrived. **Toxicology**, v. 425, p. 152249, 1 set. 2019.

AGOSTINI DE MORAES, M. et al. Chitosan and alginate biopolymer membranes for remediation of contaminated water with herbicides. **Journal of Environmental Management**, v. 131, p. 222–227, 2013.

AKSU, Z.; KABASAKAL, E. Adsorption Characteristics of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) from Aqueous Solution on Powdered Activated Carbon. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 40, n. 4, p. 545–570, 2005.

ALONSO, F. G. et al. Potential of *Egeria densa* and *Pistia stratiotes* for the phytoremediation of water contaminated with saflufenacil.

<https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1936386>, v. 56, n. 7, p. 644–649, 2021.

ALVES, O. R. **Fitorremediação e efeitos ecotoxicológicos dos rejeitos de mineração de ferro após rompimento da Barragem de Fundão em Mariana-MG**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2020.

ALVES, P. R. L. et al. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, v. 90, n. 11, p. 2674–2682, 1 mar. 2013.

ALVES, P. R. L. et al. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of The Total Environment**, v. 526, p. 222–232, 1 set. 2015.

AMIN, H. et al. Phytotoxicity of Chromium on Germination, Growth and Biochemical Attributes of *Hibiscus esculentus* L. **American Journal of Plant Sciences**, 2013.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 1 mar. 2003.

ANTUNES, S. C. et al. **Structural effects of the bioavailable fraction of pesticides in soil: Suitability of elutriate testing - ScienceDirect**. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389410010411>>.

ATEEQ, B. et al. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 514, n. 1–2, p. 105–113, 15 fev. 2002.

BALIAN, E. V et al. The Freshwater Animal Diversity Assessment: an overview of the results. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 627–637, 2008.

BELGERS, J. D. M. et al. Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes. **Aquatic Botany**, v. 86, n. 3, p. 260–268, 1 abr. 2007.

BENTO, C. B. et al. Impacts of sugarcane agriculture expansion over low-intensity cattle ranch pasture in Brazil on greenhouse gases. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 980–988, 15 jan. 2018.

- BHAT, S. V et al. Oxidative stress and metabolic perturbations in *Escherichia coli* exposed to sublethal levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Chemosphere**, v. 135, p. 453–461, 2015.
- BOBÉ, A.; COSTE, C. M.; COOPER, J. F. Factors Influencing the Adsorption of Fipronil on Soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4861–4865, 1997.
- BOIVIN, A. et al. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. **Environmental Pollution**, v. 138, n. 1, p. 92–99, 1 nov. 2005.
- BONINI DA LUZ, F. et al. Linking Soil Water Changes to Soil Physical Quality in Sugarcane Expansion Areas in Brazil. **Water**, v. 12, n. 11, p. 3156, 12 nov. 2020.
- BORDONAL, R. DE O. et al. Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, n. 2, p. 13, 27 fev. 2018.
- BORRELLI, P. et al. Land use and climate change impacts on global soil erosion by water (2015-2070). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 36, p. 21994–22001, 8 set. 2020.
- BOTERO, L. R. et al. Formation of 2,4-D bound residues in soils: New insights into microbial metabolism. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 715–722, 15 abr. 2017.
- BOUCARD, T. K. et al. Influence of plants on the chemical extractability and biodegradability of 2,4-dichlorophenol in soil. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 1, p. 53–62, 2005.
- BRASIL. Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Padrão de Potabilidade. Portaria n° 888, de 4 de maio de 2021. p. 29, 2021.
- BURNS, C. J.; SWAEN, G. M. H. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, n. 9, p. 768–786, 10 out. 2012.
- CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Chemical hormesis: its historical foundations as a

- biological hypothesis. **Human & Experimental Toxicology**, v. 19, p. 2–31, 2000.
- CALATAN, G. et al. Determining the Optimum Addition of Vegetable Materials in Adobe Bricks. **Procedia Technology**, v. 22, p. 259–265, 2016.
- CANISARES, L. P. et al. Soil microstructure alterations induced by land use change for sugarcane expansion in Brazil. **Soil Use and Management**, v. 36, n. 2, p. 189–199, 1 abr. 2020.
- CARMO, M. L. et al. Influência do período de cultivo de *Panicum maximum* (cultivar Tanzânia) na fitorremediação de solo contaminado com picloram. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 315–322, jun. 2008.
- CENKCI, S. et al. Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 7, p. 1558–1564, out. 2010.
- CESCHIN, S.; BELLINI, A.; SCALICI, M. Aquatic plants and ecotoxicological assessment in freshwater ecosystems: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 5, p. 4975–4988, 1 fev. 2021.
- CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Vinhaça - Critérios e Procedimentos para aplicação no solo agrícola. P4.231. 2015.
- CETESB. **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo. Relatórios**. São Paulo: [s.n.].
- CHANDEL, A. K. et al. Sugarcane bagasse and leaves: Foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11–20, jan. 2012.
- CHANDER, P. D.; FAI, C. M.; KIN, C. M. Removal of Pesticides Using Aquatic Plants in Water Resources: A Review. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 164, n. 1, p. 012027, jun. 2018.
- CHATTERJEE, N. S.; GUPTA, S. Fipronil Mobility and Transformation in Undisturbed Soil Columns. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, n. 2, p. 152–156, 2010.
- CHEN, Y. et al. Agricultural pollution and regulation: How to subsidize agriculture? **Journal**

of **Cleaner Production**, v. 164, p. 258–264, 2017.

CHERUBIN, M. R. et al. Land Use and Management Effects on Sustainable Sugarcane-Derived Bioenergy. **Land**, v. 10, n. 1, p. 72, 15 jan. 2021.

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013.

CHRISTOFOROU, E. et al. Cradle to site Life Cycle Assessment (LCA) of adobe bricks. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 443–452, 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de cana-de-açúcar (2020/2021). v. 7, p. 62, 2020.

COSTA, D. DOS S. et al. In vitro development of green manures: phytotoxicity and remediation of 2,4-D / Desenvolvimento in vitro de adubos verdes: fitotoxicidade e remediação de 2,4-D. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 40551–40568, 25 maio 2022a.

COSTA, R. et al. Phytotoxicity and physiological changes in *Schinus terebinthifolius* Raddi under simulated 2,4-D drift and dicamba. **Revista Ceres**, v. 69, n. 3, p. 314–322, 13 jun. 2022b.

COTILLAS, S. et al. Removal of 2,4-D herbicide in soils using a combined process based on washing and adsorption electrochemically assisted. **Separation and Purification Technology**, v. 194, p. 19–25, 2018.

CREMONEZ, P. A. et al. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 415–428, 2015.

CYCON, M.; MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. **Chemosphere**, v. 172, p. 52–71, 1 abr. 2017.

DAAM, M. A. et al. Environmental risk assessment of pesticides in tropical terrestrial ecosystems: Test procedures, current status and future perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, p. 534–547, 15 out. 2019.

DAVIS, A. M. et al. Environmental impacts of irrigated sugarcane production: Herbicide runoff dynamics from farms and associated drainage systems. **Agriculture, Ecosystems &**

Environment, v. 180, p. 123–135, 2013.

DEFANTE, L. R.; VILPOUX, O. F.; SAUER, L. Rapid expansion of sugarcane crop for biofuels and influence on food production in the first producing region of Brazil. **Food Policy**, 2018.

DHIR, B.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. P. Potential of Aquatic Macrophytes for Removing Contaminants from the Environment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 9, p. 754–781, 2009.

DOLUI, D. et al. Amelioration of sodium and arsenic toxicity in *Salvinia natans* L. with 2,4-D priming through physiological responses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 6, p. 9232–9247, 1 fev. 2022.

DOLUI, D.; SAHA, I.; ADAK, M. K. 2, 4-D removal efficiency of *Salvinia natans* L. and its tolerance to oxidative stresses through glutathione metabolism under induction of light and darkness. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111708, 15 jan. 2021.

DOSNON-OLETTE, R. et al. Potential Use of *Lemna Minor* for the Phytoremediation of Isoproturon and Glyphosate. **International Journal of Phytoremediation**, v. 13, n. 6, p. 601–612, 14 mar. 2011.

DOSNON-OLETTE, R.; COUDERCHET, M.; EULLAFFROY, P. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2096–2101, 2009.

DUDEN, A. S. et al. Hydrological impacts of ethanol-driven sugarcane expansion in Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 282, p. 111942, 15 mar. 2021.

EBKE, K. P.; FELTEN, C.; DÖREN, L. Impact of heterophylly on the sensitivity of *Myriophyllum aquaticum* biotests. **Environmental Sciences Europe**, v. 25, n. 1, p. 1–9, 5 mar. 2013.

EC. **European Commission. Council Directive 98/83/EC**, 1998. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF>>

EEVERS, N.; WHITE, J. C.; WEYENS, N. Bio- and Phytoremediation of Pesticide-Contaminated Environments: A Review. **Advances in Botanical Research**, v. 83, p. 277–318, 1 jan. 2017.

EVANGELOU, M. W. H. et al. Phytomanagement: Phytoremediation and the Production of Biomass for Economic Revenue on Contaminated Land. In: **Phytoremediation**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 115–132.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT, Agri-environmental Indicators / Pesticides.**, 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP>>

FARIA, O. B. **Utilização de macrófitas aquáticas na produção de adobe: um estudo de caso no reservatório de Salto Grande (Americana - SP)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2002.

FERNANDES, K. D. et al. Can we use Cd-contaminated macrophytes for biogas production? **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–11, 2018.

FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, M. D. et al. Soil Pollution Remediation. **Encyclopedia of Toxicology**, p. 344–355, 1 jan. 2014.

FERREIRA FILHO, J. B. DE S.; HERRIDGE, M. Ethanol expansion and indirect land use change in Brazil. **Land Use Policy**, v. 36, p. 595–604, 2014.

FIGUEIRÊDO, L. P. DE et al. Impact of temperature on the toxicity of Kraft 36 EC® (a.s. abamectin) and Score 250 EC® (a.s. difenoconazole) to soil organisms under realistic environmental exposure scenarios. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 194, p. 110446, 1 maio 2020.

FIGUEIRÊDO, L. P. **Avaliação dos efeitos de pesticidas em ecossistemas terrestres e aquáticos utilizando sistemas experimentais integrados**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2019.

FILOSO, S. et al. Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1847–1856, 2015.

FLORIDO, F. G. et al. The absorption and translocation of imazaquin in green manures. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 3, p. 291, 7 jul. 2014.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água na bacia do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 1997.

FRANCO, A. L. C. et al. Loss of soil (macro)fauna due to the expansion of Brazilian sugarcane acreage. **Science of The Total Environment**, v. 563–564, p. 160–168, 1 set. 2016.

FREITAS, I. B. F. et al. The Longitudinal Profile of a Stream Contaminated With 2,4-D and its Effects on Non-Target Species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 1, p. 1–11, 19 nov. 2022a.

FREITAS, J. S. et al. Realistic exposure to fipronil, 2,4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. **Environmental Pollution**, v. 299, p. 118894, 15 abr. 2022b.

FUESS, L. T. et al. Pros and cons of fertirrigation with in natura sugarcane vinasse: Do improvements in soil fertility offset environmental and bioenergy losses? **Journal of Cleaner Production**, v. 319, p. 128684, 15 out. 2021.

GARABRANT, D. H.; PHILBERT, M. A. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 233–257, 2002.

GERMAINE, K. J. et al. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **FEMS microbiology ecology**, v. 57, n. 2, p. 302–310, 2006.

GLICK, B. R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 5, p. 383–393, 2003.

GŁODOWSKA, M.; WOZNIAK, M. Changes in Soil Microbial Activity and Community Composition as a Result of Selected Agricultural Practices. **Agricultural Sciences**, v. 10, n. 03, p. 330–351, 11 mar. 2019.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, n. 6, p. 2086–2097, 2008.

GONG, X. et al. Pyrolysis and reutilization of plant residues after phytoremediation of heavy metals contaminated sediments: For heavy metals stabilization and dye adsorption. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 64–71, 2018.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169–185, 1 set. 2015.

GOULART, B. V. et al. Matrix effect challenges to quantify 2,4-D and fipronil in aquatic systems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 12, p. 797, 27 dez. 2020.

GREGORY ROBSON, M. et al. Impact of Pesticides on Human Health in the Last Six Years in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2022, Vol. 19, Page 3198, v. 19, n. 6, p. 3198, 9 mar. 2022.

GUITTONNY-PHILIPPE, A. et al. Selection of wild macrophytes for use in constructed wetlands for phytoremediation of contaminant mixtures. **Journal of Environmental Management**, v. 147, p. 108–123, 2015.

HATTAB, S. et al. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in the earthworm *Eisenia andrei* after exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 76–82, 1 dez. 2015.

HAYASAKA, D. et al. Differences in susceptibility of five cladoceran species to two systemic insecticides, imidacloprid and fipronil. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 2, p. 421–427, 5 mar. 2012.

HIRA, A.; DE OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. **Energy Policy**, v. 37, n. 6, p. 2450–2456, 1 jun. 2009.

HOAGLAND, D. R.; ARNOLD, D. I. **The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950.

HOGARTH, J. R. Evolutionary models of sustainable economic change in Brazil: No-till agriculture, reduced deforestation and ethanol biofuels. **Environmental Innovation and Societal Transitions**, v. 24, p. 130–141, 2017.

HOU, D.; AL-TABBAA, A. Sustainability: A new imperative in contaminated land remediation. **Environmental Science & Policy**, v. 39, p. 25–34, 1 maio 2014.

HUA, S. et al. Remediation of organochlorine pesticides contaminated lake sediment using activated carbon and carbon nanotubes. **Chemosphere**, v. 177, p. 65–76, 2017.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama das cidades - SP**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/panorama>>.

IBRAHIM, S. I. et al. Phytoremediation of atrazine-contaminated soil using *Zea mays* (maize). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 58, n. 1, p. 69–75, 2013.

ISLAM, F. et al. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, p. 332–351, 1 fev. 2018.

- ISO. International Organization and Standardization. ISO 11269–2. Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants, 2012.
- JAMES, S.; BOONE, M. Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. **Applied Herpetology**, v. 2, n. 3, p. 231–257, 1 ago. 2005.
- JONKER, M. J. et al. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2701–2713, 2005.
- KANG, J. W. Removing environmental organic pollutants with bioremediation and phytoremediation. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 6, p. 1129–1139, 2014.
- KARAISSMAILOGLU, M. C. Assessments on the potential genotoxic effects of fipronil insecticide on *Allium cepa* somatic cells. **Caryologia**, v. 70, n. 4, p. 378–384, 2 out. 2017.
- KIM, S. et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D1388–D1395, 8 jan. 2021.
- KONWICK, B. J. et al. Acute enantioselective toxicity of fipronil and its desulfinyl photoproduct to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 2350, 1 set. 2005.
- LANGMUIR, D. **Aqueous environmental geochemistry**. [s.l.] Prentice-Hall, Inc., 1997.
- LIMA, J. Z. et al. Biochar-pesticides interactions: An overview and applications of wood feedstock for atrazine contamination. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 5, p. 108192, 1 out. 2022.
- LOSSAU, S. et al. Brazil's current and future land balances: Is there residual land for bioenergy production? **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 452–461, 2015.
- LOURENZANI, W. L. et al. Land use change from the sugar cane expansion in the western region of São Paulo state, Brazil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 11, p. 1980–1987, 2014.
- LOZANO, V. L. et al. Effects of glyphosate and 2,4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: a microcosms approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 1010–1019, 1 fev. 2018.
- LU, B. et al. Removal of water nutrients by different aquatic plant species: An alternative

way to remediate polluted rural rivers. **Ecological Engineering**, v. 110, p. 18–26, 1 jan. 2018.

LUDOVICE, M. T. F. Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre o lençol freático. 1997.

LV, T. et al. Phytoremediation of imazalil and tebuconazole by four emergent wetland plant species in hydroponic medium. **Chemosphere**, v. 148, p. 459–466, 2016.

MADALAO, J. C. et al. Selection of species tolerant to the herbicide sulfentrazone with potential for phytoremediation of contaminated soils. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2199–2214, 5 dez. 2012.

MANDAL, K.; SINGH, B. Dissipation of fipronil granule formulation in sugarcane field soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 142–147, 2013.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 22 jun. 2022.

MAPBIOMAS. **Projeto MapBiomass. Coleção 3.1 da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso de Solo do Brasil**.

MARCHESAN, E. et al. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053–1059, 28 maio 2010.

MARTINELLI, L. A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: Environmental and social challenges. **Ecological Applications**, v. 18, n. 4, p. 885–898, 1 jun. 2008.

MARTÍNEZ-RUIZ, E. B.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Exposure to the herbicide 2,4-D produces different toxic effects in two different phytoplankters: A green microalga (*Ankistrodesmus falcatus*) and a toxigenic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). **Science of The Total Environment**, v. 619–620, p. 1566–1578, 2018.

MARTÍNI, A. F. et al. Is soil quality a concern in sugarcane cultivation? A bibliometric review. **Soil and Tillage Research**, v. 204, p. 104751, 1 out. 2020.

MENDES, K. F. et al. Phytoremediation of quinclorac and tebuthiuron-polluted soil by green

- manure plants. **International Journal of Phytoremediation**, p. 1–8, 1 out. 2020.
- MENEZES-OLIVEIRA, V. B. DE; BIANCHI, M. DE O.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Hazard assessment of the pesticides KRAFT 36 EC and SCORE in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2919–2924, 23 fev. 2018.
- MERINI, L. J. et al. Dissipation of 2,4-D in soils of the Humid Pampa region, Argentina: A microcosm study. **Chemosphere**, v. 68, n. 2, p. 259–265, 1 jun. 2007.
- MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58–66, 1 abr. 2017.
- MOREIRA, R. A. et al. Exposure to environmental concentrations of fipronil and 2,4-D mixtures causes physiological, morphological and biochemical changes in *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111180, 15 dez. 2020.
- MOSTERT, M. A.; SCHOEMAN, A. S.; MERWE, M. VAN DER. The relative toxicities of insecticides to earthworms of the *Pheretima* group (Oligochaeta). **Pest Management Science**, v. 58, n. 5, p. 446–450, maio 2002.
- NALEWAJA, J. D.; MATYSIAK, R. 2,4-D and Salt Combinations Affect Glyphosate Phytotoxicity. **Weed Technology**, v. 6, n. 2, p. 322–327, jun. 1992.
- NAZ, A. et al. Potential human health hazard due to bioavailable heavy metal exposure via consumption of plants with ethnobotanical usage at the largest chromite mine of India. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 42, n. 12, p. 4213–4231, 1 dez. 2020.
- NHMRC. Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra. 2011.
- ODUM, E. P. The Mesocosm. **BioScience**, v. 34, n. 9, p. 558–562, out. 1984.
- OGURA, A. P. et al. A review of pesticides sorption in biochar from maize, rice, and wheat residues: Current status and challenges for soil application. **Journal of Environmental Management**, v. 300, p. 113753, 15 dez. 2021.
- OGURA, A. P. et al. Irrigation with water contaminated by sugarcane pesticides and vinasse

- can inhibit seed germination and crops initial growth. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 1, p. 12, 9 fev. 2022a.
- OGURA, A. P. et al. An overview of the sugarcane expansion in the state of São Paulo (Brazil) over the last two decades and its environmental impacts. **Sustainable Production and Consumption**, v. 32, p. 66–75, 1 jul. 2022b.
- OGURA, A. P. et al. Environmental analysis of the eutrophication and spread of aquatic macrophytes in a tropical reservoir: a case study in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research 2022**, v. 1, p. 1–12, 19 jul. 2022c.
- OLETTE, R. et al. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. **Chemosphere**, v. 70, n. 8, p. 1414–1421, 1 fev. 2008.
- ÖZKUL, M. et al. Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2395–2405, dez. 2016.
- PACHECO, L. P. et al. Tolerância do milheto (*Pennisetum americanum*) ao 2,4-D. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 173–179, jan. 2007.
- PALMA, H. et al. Assessment of microalga biofilms for simultaneous remediation and biofuel generation in mine tailings water. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 327–335, 2017.
- PANDEY, V. C.; BAJPAI, O.; SINGH, N. Energy crops in sustainable phytoremediation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 58–73, 2016.
- PANTAWONG, R. et al. Experimental Investigation of Biogas Production from Water Lettuce, *Pistia stratiotes* L. **Emer Life Sci Res**, v. 1, n. 2, p. 41–46, 2015.
- PARTEY, S. T. et al. Biochar use in a legume–rice rotation system: effects on soil fertility and crop performance. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 2, p. 199–215, fev. 2016.
- PETERSON, M. A. et al. 2,4-D Past, Present, and Future: A Review. **Weed Technology**, v. 30, n. 2, p. 303–345, jun. 2016.
- PETERSSON, A. et al. Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 11, p. 812–819, 2007.

- PINO-OTÍN, M. R. et al. Effects of the insecticide fipronil in freshwater model organisms and microbial and periphyton communities. **Science of The Total Environment**, v. 764, p. 142820, 10 abr. 2021.
- PINTO, A. C. et al. **Biodiesel: An overview** **Journal of the Brazilian Chemical Society** Sociedade Brasileira de Quimica, , 2005. Disponível em: <www.scielo.br,>. Acesso em: 19 abr. 2021
- PINTO, T. J. DA S. et al. Functional responses of *Hyaella meinerti* after exposure to environmentally realistic concentrations of 2,4-D, fipronil, and vinasse (individually and in mixture). **Aquatic Toxicology**, v. 231, p. 105712, 1 fev. 2021a.
- PINTO, T. J. DA S. et al. Impact of 2,4-D and fipronil on the tropical midge *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, p. 111778, 1 fev. 2021b.
- PINTO, T. J. DA S. et al. Toxicity of fipronil and 2,4-D formulations (alone and in a mixture) to the tropical amphipod *Hyaella meinerti*. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–14, 17 mar. 2021c.
- PIRES, F. R. et al. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 333–341, 2003.
- PIRES, F. R. et al. Fitorremediação de solos contaminados com tebuthiuron utilizando-se espécies cultivadas para adubação verde. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 711–717, dez. 2005.
- PIRES, F. R. et al. Avaliação da fitorremediação de tebuthiuron utilizando crotalaria juncea como planta indicadora. **Rev. Ciên. Agron**, v. 39, n. 02, p. 245–250, 2008.
- POWER, A. G. Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2959–2971, 2010.
- POWLSON, D. S. et al. Soil management in relation to sustainable agriculture and ecosystem services. **Food Policy**, v. 36, n. SUPPL. 1, p. S72–S87, 1 jan. 2011.
- PRASERTSUP, P.; ARIYAKANON, N. Removal of Chlorpyrifos by Water Lettuce (*Pistia stratiotes* L.) and Duckweed (*Lemna minor* L.). **International Journal of Phytoremediation**, v. 13, n. 4, p. 383–395, 18 fev. 2011.

QU, M. et al. Distribution of atrazine and its phytoremediation by submerged macrophytes in lake sediments. **Chemosphere**, v. 168, p. 1515–1522, 2017.

RAMASUBRAMANIAN, T.; PARAMASIVAM, M. Determination and dissipation of fipronil and its metabolites in/on sugarcane crop. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 97, n. 11, p. 1037–1052, 2017.

RAMBORGER, B. P. et al. The phytoremediation potential of *Plectranthus neochilus* on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of antioxidant capacity in herbicide tolerance. **Chemosphere**, v. 188, p. 231–240, 2017.

RIAZ, G. et al. Phytoremediation of organochlorine and pyrethroid pesticides by aquatic macrophytes and algae in freshwater systems. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, n. 10, p. 894–898, 2017.

RODRIGUES, A. F. et al. Systematic review of soil ecosystem services in tropical regions. **Royal Society Open Science**, v. 8, n. 3, p. rsos.201584, 24 mar. 2021.

RODRIGUES REIS, C. E.; HU, B. Vinasse from Sugarcane Ethanol Production: Better Treatment or Better Utilization? **Frontiers in Energy Research**, v. 5, p. 7, 10 abr. 2017.

ROMEY, A. A. A. Green Silver Nanoparticles for Enhancing the Phytoremediation of Soil and Water Contaminated by Fipronil and Degradation Products. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 5, p. 147, 2018.

ROMEIRO, S. et al. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* L. **Bragantia**, v. 66, n. 2, p. 327–334, 2007.

RUIZ DE ARCAUTE, C.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 222–229, 2016.

SAN MIGUEL, A. et al. Phenylpyrazoles impact on *Folsomia candida* (Collembola). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2351–2357, 1 set. 2008.

SANCHES, A. L. M. et al. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, p. 582–587, 1 dez. 2017.

SANTOS, J. B. et al. Fitorremediação do herbicida trifloxysulfuron sodium. **Planta**

Daninha, v. 22, n. 2, p. 323–330, jun. 2004.

SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B. Pesticides meet megadiversity in the expansion of biofuel crops. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 9, n. 4, p. 215–221, 2011.

SILVA, L. C. M. et al. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology**, n. Agrofit, p. 1–14, 29 ago. 2020.

SILVA, L. C. M. et al. Lethal and sublethal toxicity of pesticides and vinasse used in sugarcane cultivation to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). **Aquatic Toxicology**, v. 241, p. 106017, 1 dez. 2021.

SIMON-DELSO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5–34, jan. 2015.

SINGH, B.; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245–261, 2016.

SINGH, N. S. et al. A comprehensive review of environmental fate and degradation of fipronil and its toxic metabolites. **Environmental Research**, v. 199, p. 111316, 1 ago. 2021.

SONG, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 2, p. 106–113, 2014.

SOTERRONI, A. C. et al. Future environmental and agricultural impacts of Brazil's Forest Code. **Environmental Research Letters**, v. 13, n. 7, p. 074021, 5 jul. 2018.

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

STAVI, I.; LAL, R. Agroforestry and biochar to offset climate change: a review. **Agron. Sustain. Dev.**, v. 33, p. 81–96, 2013.

STEFANI MARGARIDO, T. C. et al. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 61–67, 2013.

SZÖCS, E. et al. Analysing chemical-induced changes in macroinvertebrate communities in aquatic mesocosm experiments: a comparison of methods. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 4, p. 760–

769, 7 maio 2015.

TAYLOR, S. G. et al. Phytotoxicity of 2,4-D and 2,4-Dichlorophenol to Red Clover (*Trifolium pratense*). **Weed Science**, v. 37, n. 6, p. 825–829, nov. 1989.

TEÓFILO, T. M. DA S. et al. Phytoextraction of diuron, hexazinone, and sulfometuron-methyl from the soil by green manure species. **Chemosphere**, v. 256, p. 127059, 1 out. 2020.

TINGLE, C. C. D. D. et al. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. . 2003, p. 1–66.

TRIQUES, M. C. et al. Assessing single effects of sugarcane pesticides fipronil and 2,4-D on plants and soil organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111622, 2021.

TUNIĆ, T. et al. Some arguments in favor of a *Myriophyllum aquaticum* growth inhibition test in a water–sediment system as an additional test in risk assessment of herbicides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 9, p. 2104–2115, 1 set. 2015.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-açúcar. FNS - Gestão dos recursos hídricos na agroindústria canavieira.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.unica.com.br/wp-content/uploads/2019/06/Gestao-dos-Recursos-Hidricos.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2022.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1900 Generic Freshwater Microcosm Test, Laboratory. p. 28, 1996a.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Ecological Effects Test Guidelines, OPPTS 850.4200, Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA 712-C-96-154. p. 7170, 1996b.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Drinking Water Standards and Health Advisories Tables. 2018.

VÁZQUEZ, J. G. et al. Physiological and Biochemical Response of Water Lettuce (*Pistia stratiotes*) to Short-Term Mild Saline Stress. **Journal of Plant Physiology & Pathology**, v. 9, n. 10, 2021.

VIANA, N. P. et al. Bioconcentration and toxicological impacts of fipronil and 2,4-D commercial formulations (single and in mixture) in the tropical fish, *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research** 2021, p. 1–14, 21 set. 2021.

VIEIRA, R. R. S. et al. Compliance to Brazil's Forest Code will not protect biodiversity and ecosystem services. **Diversity and Distributions**, v. 24, n. 4, p. 434–438, 1 abr. 2018.

VIVEIROS, W. **Chironomus sancticaroli – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2012.

VOLTOLINI, G. B. et al. Phytotoxicity and growth of coffee plants as a function of the application of herbicide 2,4-D. **Coffee Science - ISSN 1984-3909**, v. 14, n. 4, p. 438–445, 9 dez. 2019.

VRYZAS, Z. Pesticide fate in soil-sediment-water environment in relation to contamination preventing actions. . 1 ago. 2018, p. 5–9.

WESTON, D. P.; LYDY, M. J. Toxicity of the Insecticide Fipronil and Its Degradates to Benthic Macroinvertebrates of Urban Streams. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 2, p. 1290–1297, 2014.

WEYENS, N. et al. Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the challenge. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 248–254, 2009.

WHO. **World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality**, 2011.

Disponível em:

<http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_chapters/en/>

WILSON, W. A. et al. Enantioselective Chronic Toxicity of Fipronil to *Ceriodaphnia dubia*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 36–43, 9 jan. 2008.

WU, H. et al. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 9–14, 2014.

XIA, H.; MA, X. Phytoremediation of ethion by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) from water. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 8, p. 1050–1054, 1 maio 2006.

YANG, W. et al. Synthesis of Glucose–Fipronil Conjugate and Its Phloem Mobility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12534–12542, 14 dez. 2011.

YANG, X. et al. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and

phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, n. 4, p. 339–353, 2005.

YOFUKUJI, K. Y. et al. Acute Ecotoxicity of Exposure to Sugarcane Ashes on the Behaviour of Predator and Prey Fish Species. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 232, n. 8, p. 1–14, 1 ago. 2021.

YUAN, J.-G. et al. Synthesis of a Series of Monosaccharide–Fipronil Conjugates and Their Phloem Mobility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 18, p. 4236–4241, 8 maio 2013.

ZEPP, R. G. et al. Dynamics of 2,4-D esters in surface waters. Hydrolysis, photolysis, and vaporization. **Environmental Science & Technology**, v. 9, n. 13, p. 1144–1150, 1975.

ZHANG, W. et al. Ecosystem services and dis-services to agriculture. **Ecological Economics**, v. 64, n. 2, p. 253–260, 2007.

ZHU, X. et al. Herbicides interfere with antigrazer defenses in *Scenedesmus obliquus*. **Chemosphere**, v. 162, p. 243–251, 2016.