

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Escola de Engenharia de São Carlos

**Avaliação dos efeitos de agrotóxicos em  
ecossistemas aquáticos tropicais utilizando  
organismos zooplanctônicos como  
bioindicadores**

**LAÍS FERNANDA DE PALMA LOPES**

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental**

**LAÍS FERNANDA DE PALMA LOPES**

**Avaliação dos efeitos de agrotóxicos em ecossistemas  
aquáticos tropicais utilizando organismos zooplanctônicos  
como bioindicadores**

**São Carlos - SP**

**2023**



**LAÍS FERNANDA DE PALMA LOPES**

**Avaliação dos efeitos de agrotóxicos em ecossistemas  
aquáticos tropicais utilizando organismos zooplanctônicos  
como bioindicadores**

**Versão Corrigida**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de  
São Carlos da Universidade de São Paulo como  
parte dos requisitos para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta  
Espíndola

**São Carlos - SP**

**2023**

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).

D864a de Palma Lopes, Laís Fernanda  
Avaliação dos efeitos de agrotóxicos em ecossistemas aquáticos tropicais utilizando organismos zooplanctônicos como bioindicadores / Laís Fernanda de Palma Lopes; orientador Evaldo Luiz Gaeta Espíndola. São Carlos, 2023.

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, 2023.

1. Zooplâncton. 2. Copepoda Calanoida. 3. Mistura. 4. Mesocosmo. 5. Modelos Ecológicos. 6. Agrotóxico. I. Título.

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Oceanóloga **LAÍS FERNANDA DE PALMA LOPES**.

Título da tese: "Avaliação dos efeitos de agrotóxicos em ecossistemas aquáticos tropicais utilizando organismos zooplanctônicos como bioindicadores.

Data da defesa: 03/02/2023.

### Comissão Julgadora

### Resultado

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

Aprovada

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

Aprovada

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

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

Aprovada

Profa. Dra. **Suzelei Rodgher**

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

Aprovada

Profa. Dra. **Andréa Novelli**

(Universidade Federal de Sergipe/UFS)

Aprovada

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

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

## AGRADECIMENTOS

Eu agradeço principalmente a minha família por terem me proporcionado todo apoio e condições para eu poder chegar até aqui, pois sem o amor de vocês nada disso seria possível. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola pela orientação, conhecimento e ensinamentos durante o meu doutorado.

Aos meus amigos da FURG (Priscila, Giu, Paula, Carine, Maíra e Carla) e aqueles que fui fazendo durante a minha caminhada no doutorado (em especial a Stella, a Bartira, e meus professores de canto e amigos Rafa e Will) em São Carlos e na França (Flavie, Cris, Claire, Paula e Marie). Muito obrigada por terem deixado os meus dias mais leves e com mais diversão.

Às minhas colegas/amigas do NEEA, Giseli Swerts e Isabele Baima, obrigada por terem sido companheiras e dividirem os dias nas bancadas de laboratório comigo. O apoio e amizade de vocês foram super importantes.

À equipe e principalmente a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Céline Boulangé-Lecomte do laboratório “*Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques*” (SEBIO) da Université du Havre, em Le Havre, França, pela oportunidade e experiência inesquecível.

Aos professores Dr. Paulo José Duarte Neto (Universidade Federal Rural de Pernambuco) e Dr<sup>a</sup>. Carolina Reigada (Universidade Federal de São Carlos), pelo aprendizado das análises estatísticas.

Ao pessoal do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos, em especial ao Dr. Matheus Almeida Duarte e a Dr<sup>a</sup>. Tainá Alves Ribeiro, por me ensinarem a identificar as espécies e grupos do zooplâncton de água doce.

Aos demais colegas de laboratório e funcionários do NEEA/CRHEA/EESC/USP por terem me passado lições valiosas sobre trabalho em grupo.

À USP de São Carlos por toda a experiência (pessoal e profissional)!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Proc. N° 88882.379019/2019-01) e do projeto temático da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - “*Environmental effects of the pasture-sugarcane conversion and pasture intensification*” (Proc N° 2015/18790-3).

A bolsa de doutorado sanduiche foi financiada pelo programa institucional de internacionalização da CAPES-Print através do Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental (PPG-SEA) da USP (Proc. N° 88887.586154/2020-00).

*“Todos esses que aí estão  
Atravancando o meu caminho,  
Eles passarão...  
Eu passarinho!”*

*Poeminho do Contra – Mario Quintana*



## RESUMO

LOPES, L.F.P. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos em ecossistemas aquáticos tropicais utilizando organismos zooplancônicos como bioindicadores.** 2023. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

No Brasil a aplicação de agrotóxicos em cultivos de cana-de-açúcar tem causado impactos nos ecossistemas aquáticos, com perda de diversos serviços ecossistêmicos. Dentro deste contexto, os objetivos desta pesquisa foram avaliar os efeitos dos agrotóxicos (inseticida Regent 800 WG<sup>®</sup> (ingrediente ativo (i.a.) fipronil) e herbicida DMA 806 BR<sup>®</sup> (i.a. 2,4-D)) utilizados na cultura de cana-de-açúcar, isolados e em mistura, nas variáveis abióticas e bióticas do ambiente aquático (estudo em modelo ecossistêmico) e sobre o Copepoda Calanoida *Notodiaptomus iheringi*, em estudos laboratoriais (testes de toxicidade). Os experimentos em mesocosmos tiveram uma duração de 73 d e quatro tratamentos (Controle, 2,4-D, Fipronil e 2,4-D+Fipronil). As concentrações nominais de 2,4-D e fipronil aplicadas nos mesocosmos foram de 452  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 64  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Variáveis como pH, oxigênio dissolvido, condutividade, temperatura, nutrientes, metais e agrotóxicos foram monitoradas em diferentes intervalos de tempo, além da comunidade zooplancônica e da avaliação climatológica. Fipronil e 2,4-D, isolados e em mistura, não causaram mudanças nas variáveis limnológicas, porém verificou-se alterações na concentração de metais nos mesocosmos contaminados com os agrotóxicos. Na avaliação da comunidade de zooplâncton, as análises de modelos mistos demonstraram efeitos significativos dos agrotóxicos sobre Cladocera, Copepoda e Rotífera. No tratamento com o herbicida 2,4-D foi observado um aumento da abundância de Copepoda e diminuição de Cladocera e de Rotífera. O inseticida Fipronil e a mistura 2,4-D+Fipronil diminuíram a abundância de Cladocera e Copepoda e aumentaram a de Rotífera. Verificou-se, ainda, o efeito das variáveis abióticas sobre esses organismos, sendo que para Copepoda a interação entre a PC3\*tratamentos diminuiu significativamente a abundância deste grupo. Nesta análise, a PC3 é representada negativamente pelas variáveis oxigênio dissolvido e turbidez, e positivamente pelas variáveis fósforo total, íon amônio e nitrato. Na abordagem ecotoxicológica, a concentração real letal (CL)<sub>50-48h</sub> de 2,4-D e fipronil para adultos de *N. iheringi* foram: 478,24  $\pm$  107,77  $\text{mg L}^{-1}$  e 4,97  $\pm$  3,30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. A mistura desses dois agrotóxicos pode desencadear sinergismo na mortalidade de *N. iheringi* em altas concentrações. Embora 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura não tenham ocasionado mudanças nas variáveis limnológicas durante os 73 d, os mesmos demonstraram ser potenciais fontes de metais aos mesocosmos. Nos tratamentos que receberam os agrotóxicos, isolados ou em mistura, foram verificadas alterações na abundância e nas interações biológicas entre os grupos do zooplâncton. Cladocera e Copepoda não se recuperaram nos tratamentos contendo fipronil após 73 d. O fipronil, em concentrações ambientais e na mistura com 2,4-D, foram tóxicos a *N. iheringi*.

**Palavras-chave:** Zooplâncton; Copepoda Calanoida; Mistura; Mesocosmo; Agrotóxico; Ecotoxicologia.

## ABSTRACT

LOPES, L.F.P. **Evaluation of pesticides effects on tropical aquatic ecosystems using zooplankton organisms as bioindicators.** 2023. Thesis (Doctor in Science) - São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2023.

In Brazil, the application of pesticides on sugarcane crops has impacted aquatic ecosystems leading to the loss of many ecosystems services. The aims of this study were to evaluate the effects of pesticides (the insecticide Regent 800 WG<sup>®</sup> (active ingredient (a.i.) fipronil) and the herbicide DMA 806 BR<sup>®</sup> (a.i. 2,4-D)) used on sugarcane crops, isolate and in mixture, on the aquatic environmental abiotic and biotics variables (studies in ecosystem models) and on the Calanoida copepod *Notodiaptomus iheringi*, in laboratory studies (ecotoxicity tests). The experiments in mesocosms lasted for 73 d and using four treatments (Control, 2,4-D, Fipronil and 2,4-D+Fipronil). 2,4-D and fipronil nominal concentrations applied in the mesocosm were 452  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 64  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. Variables such as pH, dissolved oxygen, conductivity, temperature, nutrients, metals and pesticides were surveyed at different time intervals, as well as the zooplankton community and climatological variables. Fipronil and 2,4-D, isolate and in mixture, did not trigger changes on the limnological variables. However, alterations in the concentration of metals were verified in the mesocosms contaminated with pesticides. When evaluating the zooplankton community, mixed models analyzes showed significant effects of the pesticides on Cladocera, Copepoda and Rotifera. The herbicide 2,4-D increased the abundance of Copepoda, and decreased the abundance of Cladocera and Rotifera. The Fipronil and the mixture of 2,4-F+Fipronil decrease the abundance of Cladocera and Copepoda and increased the abundance of Rotifera. The interaction of PC3\*treatments decreased significantly the abundance of Copepoda. In this analysis, PC3 is represented negatively by the variables dissolved oxygen and turbidity, and positively by the variables total phosphorus, ammonium ion and nitrate. In the ecotoxicological approach, the lethal concentration (LC)<sub>50-48h</sub> of 2,4-D and fipronil on adults of *N. iheringi* were: 478.24  $\pm$  107.77  $\text{mg L}^{-1}$  and 4.97  $\pm$  3.30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The mixture of these pesticides can trigger synergism on mortality of *N. iheringi* at high concentrations. The 2,4-D and fipronil, isolate and in mixture, did not generate changes on the limnological variables for 73 d; however, they were potential sources of metals in the mesocosms. The treatments with pesticides caused effects on the abundance and the biological interactions among zooplankton groups. Cladocera and Copepoda did not recover in treatments containing fipronil after 73 d. Environmental concentration of fipronil and the mixture with 2,4-D were toxic to *N. iheringi*.

**Keywords:** Zooplankton; Calanoida Copepoda; Mixture; Mesocosm; Pesticides; Ecotoxicology.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografia de *Notodiaptomus iheringi*. As barras em vermelho indicam a estrutura do prossoma do copépodo. **a)** macho (comprimento do prossoma  $1,03 \pm 0,02 \mu\text{m}$  (OKUMURA, 2011)) e **b)** fêmea (comprimento do prossoma  $1,47 \pm 0,07 \mu\text{m}$  (OKUMURA, 2011)). Foto: Laís Fernanda de Palma Lopes..... 9
- Figura 2.** Delineamento experimental do presente estudo.  $CL_{50}$  – Concentração letal a 50% dos organismos testados;  $CL_{20}$  – Concentração letal a 20% dos organismos testados;  $CL_{10}$  – Concentração letal a 10% dos organismos testados; e  $CE_{10}$  – Concentração que causa efeito a 10% dos organismos testados. .... 43
- Figura 3.** **a)** Mapa do Brasil destacando em cinza o estado de São Paulo; **b)** Mapa do estado de São Paulo mostrando em um ponto vermelho a localização do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), em Itirapina; **c)** Foto mostrando a disposição dos mesocosmos no campo; **d)** Mesocosmo Controle “C1”- réplica um do tratamento sem contaminação; **e)** Mesocosmo 2,4-D “D2”- réplica dois do tratamento contaminado com  $452 \mu\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D; **f)** Mesocosmo Fipronil “F1”- réplica um do tratamento contaminado com  $64 \mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; e **g)** Mesocosmo mistura 2,4-D+Fipronil “M3” – réplica três do tratamento contaminado com  $452 \mu\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D e  $64 \mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil. Foto: Grupo de pesquisa do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA). .... 48
- Figura 4.** Mesocosmos nas fases de: **a)** preparação; **b)** aclimatação; e **c)** pós contaminação. Foto: Grupo de pesquisa do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA). .... 51
- Figura 5.** Processos para o estabelecimento do cultivo de *Notodiaptomus iheringi* em laboratório. **a)** Isolamento de fêmeas ovadas de Calanoida, coletadas do ambiente, em tubos de ensaio; **b)** Cultivos de 1 L com alguns organismos de *N. iheringi* para permitir o crescimento da população; **c)** Redes utilizadas para a manutenção dos cultivos; **d)** Manutenção dos cultivos de *N. iheringi* já sincronizados por idade; **e)** Recipiente com meio algal (*Raphidocelis subcapitata*) em uma densidade de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  para alimentar os organismos do cultivo; e **f)** Contagem de células de *R. subcapitata* em câmara de Neubauer sob microscópio para a estimativa da densidade de algas para a alimentação..... 60
- Figura 6.** **a)** Bandejas com as unidades experimentais do teste de toxicidade com os agrotóxicos isolados; **b)** Bandejas com as unidades experimentais do teste de toxicidade com a mistura dos agrotóxicos; e **c)** folha de teste. .... 62
- Figura 7.** Valores dos parâmetros climatológicos da região do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA). **a)** Temperatura do ar; **b)** Temperatura da água; **c)** Radiação; **d)** Velocidade do vento em 2.00 m de altitude; **e)** Precipitação; e **f)** Evaporação. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0) e eles estão representados em pontos vermelhos sobre a linha do tempo. .... 76
- Figura 8.** Valores médios das concentrações dos agrotóxicos medidas em cada tratamento ao longo do tempo. **a)** 2,4-D; e **b)** Fipronil. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). As barras representam os valores

médios “+” os desvios padrão. Treatment = tratamento e Control = tratamento controle.  
 ..... 77

**Figura 9.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos em cada tratamento ao longo do tempo. **a)** pH= potencial de hidrogênio; **b)** OD= Oxigênio dissolvido; **c)** CE= condutividade elétrica; **d)** Turb= turbidez; **e)** Cl a= clorofila a; e **f)** Cl b= clorofila b. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). As barras representam os valores médios “+” os desvios padrão. Control = tratamento controle.....78

**Figura 10.** Análise *Parallel* da análise de componentes principais/ *principal components analysis* (PCA) das variáveis físicas e químicas nos mesocosmos durante o experimento. *Component number*= número de componentes; valores eigen das componentes principais; PC actual data= dados atuais da PC; PC simulated data = dados simulados das PC; e PC resampled data= dados reamostrados da PC..... 80

**Figura 11.** Contribuição das variáveis (%) da análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) para: **a)** componente principal/*principal component* (PC) 1; **b)** PC2; e **c)** PC3. Clb= clorofila b, Cla= clorofila a, pH= potencial de hidrogênio, CE= condutividade elétrica, OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez. As linhas pontilhadas vermelhas correspondem ao valor esperado caso a contribuição fosse uniforme. As contribuições acima da linha de referência podem ser consideradas como contribuições importantes para a PC. .... 81

**Figura 12.** Análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) das variáveis físicas e químicas e suas componentes principais/ *principal component* (PC): **a)** PC1 versus PC2; e **b)** PC1 versus PC3. Clb= clorofila b, Cla= clorofila a, pH= potencial de hidrogênio, CE= condutividade elétrica, OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez. As flechas representam a magnitude e a direção da contribuição de cada uma das variáveis..... 81

**Figura 13.** *Scores* médios das componentes principais/*principal components* (PC) das variáveis limnológicas medidas *in situ*, ao longo do tempo por tratamento. **a)** PC1 foi gerada por meio da contribuição das variáveis Clb= clorofila b, Cla= clorofila a e pH= potencial de hidrogênio; **b)** PC2 foi gerada por meio da contribuição das variáveis OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez; e **c)** PC3 foi gerada por meio da contribuição das variáveis OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). “+” significa que a PC se relaciona positivamente com a variável. “-” significa que a PC se relaciona negativamente com a variável. As barras representam os valores médios + os desvios padrão. Control = tratamento Controle. .... 82

**Figura 14.** Valores médios dos nutrientes em cada tratamento ao longo do tempo. **a)** Nitrogênio total de Kjeldahl; **b)** íon amônio; **c)** Nitrito; **d)** Nitrato; **e)** Fósforo total; **f)** Fosfato inorgânico; **g)** Fosfato total dissolvido; e **h)** Silicato reativo. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). As barras representam os valores médios “+” os desvios padrão. Control = tratamento controle. .... 83

**Figura 15.** Análise *Parallel* da análise de componentes principais/ *principal components analysis* (PCA) dos nutrientes nos mesocosmos durante o experimento. *Component number*= número de componentes; valores eigen das componentes principais; PC actual data= dados atuais da PC; PC simulated data = dados simulados das PC; e PC resampled data= dados reamostrados da PC. .... 86

**Figura 16.** Contribuição das variáveis (%) da análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) para: **a)** componente principal/*principal component* (PC) 1; **b)** PC2; **c)** PC3; e **d)** PC4. NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, PT= fósforo total, NO<sub>2</sub>= nitrito, PI= fosfato inorgânico, PTD= fosfato total dissolvido, NO<sub>3</sub>= nitrato, SIO<sub>2</sub>= silicato reativo e NH<sub>4</sub>= íon amônio. As linhas pontilhadas vermelhas correspondem ao valor esperado caso a contribuição fosse uniforme. As contribuições acima da linha de referência podem ser consideradas como contribuições importantes para a PC..... 87

**Figura 17.** Análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) dos nutrientes e suas componentes principais/*principal component* (PC): **a)** PC1 versus PC2; **b)** PC1 versus PC3; e **c)** PC1 versus PC4. NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, PT= fósforo total, NO<sub>2</sub>= nitrito, PI= fosfato inorgânico, PTD= fosfato total dissolvido, NO<sub>3</sub>= nitrato, SIO<sub>2</sub>= silicato reativo e NH<sub>4</sub>= íon amônio. As flechas representam a magnitude e a direção da contribuição de cada uma das variáveis..... 87

**Figura 18.** Scores médios das componentes principais/*principal components* (PC) dos nutrientes ao longo do tempo por tratamento. **a)** PC1 foi gerada por meio da contribuição das variáveis PI= fosfato inorgânico, PTD= fosfato total dissolvido e PT= fósforo total. **b)** PC2 foi gerada por meio da contribuição das variáveis NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, NH<sub>4</sub>= íon amônio, PT e SIO<sub>2</sub>= silicato reativo. **c)** PC3 foi gerada pela contribuição das variáveis NO<sub>2</sub>= nitrito, NO<sub>3</sub>= nitrato e NH<sub>4</sub>. E **d)** PC4 foi gerada pela contribuição das variáveis PTD, SIO<sub>2</sub>, PT e NTK. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). “+” significa que a PC se relaciona positivamente com a variável. “-” significa que a PC se relaciona negativamente com a variável. As barras representam os valores médios + os desvios padrão. Control = tratamento Controle..... 88

**Figura 19.** Valores médios dos metais em cada tratamento ao longo do tempo. **a)** Alumínio; **b)** Bário; **c)** Cádmio; **d)** Cobalto; **e)** Cromo; **f)** Cobre; **g)** Potássio; **h)** Manganês; **i)** Molibdênio; **j)** Níquel; **k)** Chumbo; **l)** Estrôncio; e **m)** Zinco. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). As barras representam os valores médios “+” os desvios padrão. Control = tratamento controle..... 91

**Figura 20.** Análise *Parallel* da análise de componentes principais/*principal components analysis* (PCA) dos metais nos mesocosmos durante o experimento. *Component number*= número de componentes; valores eigen das componentes principais; PC actual data= dados atuais da PC; PC simulated data = dados simulados das PC; e PC resampled data= dados reamostrados da PC..... 92

**Figura 21.** Contribuição das variáveis (%) da análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) para: **a)** componente principal/*principal component* (PC) 1; **b)** PC2; e **c)** PC3. Al= alumínio, Ba= bário, Cd= cádmio, Co=cobalto, Cr= cromo, Cu= cobre, K = potássio, Mn = manganês, Mo= molibdênio, Ni= níquel, Pb= chumbo, Sr= estrôncio e Zn= zinco. As linhas pontilhadas vermelhas correspondem ao valor esperado caso a contribuição fosse uniforme. As contribuições acima da linha de referência podem ser consideradas como contribuições importantes para a PC. .... 93

**Figura 22.** Análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) dos metais e suas componentes principais/*principal component* (PC): **a)** PC1 versus PC2; e **b)** PC1 versus PC3. Al= alumínio, Ba= bário, Cd= cádmio, Co=cobalto, Cr= cromo, Cu=

cobre, K = potássio, Mn = manganês, Mo= molibdênio, Ni= níquel, Pb= chumbo, Sr= estrôncio e Zn= zinco. As flechas representam a magnitude e a direção da contribuição de cada uma das variáveis. .... 93

**Figura 23.** Scores médios das componentes principais/*principal components* (PC) dos metais ao longo do tempo por tratamento. **a)** PC1 foi gerada pela contribuição das variáveis Mn=manganês, Ba= bário, Sr= estrôncio, K= potássio e Cu= cobre. **b)** PC2 foi gerada pela contribuição das variáveis Pb= chumbo, Ni= níquel, Zn= zinco, Co= cobalto e Mo= molibdênio. E **c)** PC3 foi gerada pela contribuição das variáveis Zn, Ni, Mo, Co e Cd=cádmio. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). “+” significa que a PC se relaciona positivamente com a variável. “-” significa que a PC se relaciona negativamente com a variável. As barras representam os valores médios + os desvios padrão. Control = tratamento Controle. .... 94

**Figura 24.** Análise *Parallel* da análise de componentes principais/*principal components analysis* (PCA) do subconjunto de dados das variáveis físicas, químicas e nutrientes nos mesocosmos durante o experimento. Component number= número de componentes; valores eigen das componentes principais; PC actual data= dados atuais da PC; PC simulated data = dados simulados das PC; e PC resampled data= dados reamostrados da PC. .... 108

**Figura 25.** Contribuição das variáveis (%) da análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) para: **a)** componente principal/*principal component* (PC) 1; **b)** PC2; **c)** PC3; e **d)** PC4. Clb= clorofila b, Cla= clorofila a, pH= potencial de hidrogênio, OD= oxigênio dissolvido, Turb= turbidez, NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, PT= fósforo total, NO<sub>2</sub>= nitrito, PI= fosfato inorgânico, PTD= fosforo total dissolvido, NO<sub>3</sub>= nitrato, SIO<sub>2</sub>= silicato e NH<sub>4</sub>= íon amônio. As linhas pontilhadas vermelhas correspondem ao valor esperado caso a contribuição fosse uniforme. As contribuições acima da linha de referência podem ser consideradas como contribuições importantes para a PC. .... 109

**Figura 26.** Análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) das variáveis físicas, químicas e nutrientes e suas componentes principais/*principal component* (PC): **a)** PC1 versus PC2; **b)** PC1 versus PC3; e **c)** PC1 versus PC4. Clb= clorofila b, Cla= clorofila a, pH= potencial de hidrogênio, OD= oxigênio dissolvido, Turb= turbidez, NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, PT= fósforo total, NO<sub>2</sub>= nitrito, PI= fosfato inorgânico, PTD= fosforo total dissolvido, NO<sub>3</sub>= nitrato, SIO<sub>2</sub>= silicato e NH<sub>4</sub>= íon amônio. As flechas representam a magnitude e a direção da contribuição de cada uma das variáveis. .... 109

**Figura 27.** Scores médios das componentes principais/*principal components* (PC) dos parâmetros físico-químicos e nutrientes ao longo do tempo por tratamento. **a)** PC1 foi gerada pela contribuição das variáveis Cla= clorofila a, Clb= clorofila b, pH= potencial de hidrogênio, SIO<sub>2</sub>= silicato reativo e PTD= fosfato total dissolvido; **b)** PC2 foi gerada pela contribuição das variáveis SIO<sub>2</sub>, PI= fosfato inorgânico, Turb= turbidez, NO<sub>3</sub>= nitrato, NO<sub>2</sub>= nitrito e PT= fósforo total; **c)** PC3 foi gerada pela contribuição das variáveis OD= oxigênio dissolvido, PT, NH<sub>4</sub>= íon amônio, NO<sub>3</sub> e Turb; e **d)** PC4 foi gerada pela contribuição das variáveis NO<sub>2</sub>, NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). “+” significa que a PC se relaciona positivamente com a variável. “-” significa que a PC se relaciona

negativamente com a variável. As barras representam os valores médios + os desvios padrão. Control = tratamento controle..... 110

**Figura 28.** Densidade média (ind L<sup>-1</sup>) dos grandes grupos do zooplâncton ao longo do tempo: **a)** densidade de Cladocera; **b)** densidade de Copepoda; e **c)** densidade de Rotífera. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). As barras representam os valores médios “+” os desvios padrão. Control = tratamento controle. .... 111

**Figura 29.** Densidade numérica (ind L<sup>-1</sup>) de Cladocera, Copepoda e Rotífera nos tratamentos Controle, 2,4-D, Fipronil e 2,4-D+Fipronil para os dias: **a)** 2; **b)** 4; **c)** 7; **d)** 14; **e)** 21; **f)** 31; **g)** 45; e **h)** 73. Os dias de coletas estão distribuídos referentes ao dia da contaminação (dia 0). Control = tratamento controle..... 112

**Figura 30.** Densidade relativa (%) entre Cladocera, Copepoda e Rotífera nos tratamentos Controle, 2,4-D, Fipronil e 2,4-D+Fipronil para os dias: **a)** 2; **b)** 4; **c)** 7; **d)** 14; **e)** 21; **f)** 31; **g)** 45; e **h)** 73. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). Control = tratamento controle. .... 113

**Figura 31.** Coeficientes de variação (C.V.) da abundância de Cladocera, de Copepoda, de Rotífera e do zooplâncton total (Total) (%) ao longo do tempo entre os mesocosmos (réplicas) dos tratamentos: **a)** Control; **b)** 2,4-D; **c)** Fipronil; e **d)** 2,4-D+Fipronil. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). Control = tratamento controle. Group = grupos..... 129

**Figura 32.** Curva de dose-resposta de adultos de *Notodiaptomus iheringi* expostos à: **a)** Fipronil (Regent 800<sup>®</sup> WG); e **b)** 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR)..... 137

**Figura 33.** *Notodiaptomus iheringi* exposto ao fipronil (Regent 800<sup>®</sup> WG) durante 48 h. **a)** fêmea ovada do Cr (controle sem agrotóxicos); **b)** macho do Cr; **c)** e **d)** macho do R2; **e)** fêmea ovada com um ovo inviável do R3; **f)** e **g)** macho do R4; e **h), i)** e **j)** macho do R5. As flechas vermelhas apontam para as deformidades, com exceção da figura “j”, a qual aponta para uma estrutura reprodutiva do fungo (conídio). Concentrações nominais - Cr: controle sem fipronil; **R1:** 1,50 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R2:** 3,00 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R3:** 6,00 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R4:** 12,00 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; e **R5:** 24,00 µg L<sup>-1</sup> de fipronil. .... 139

**Figura 34.** *Notodiaptomus iheringi* exposto ao 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR) durante 48 h. **a)** fêmea com espermatóforo do Cd (controle sem agrotóxicos); **b)** macho do D1; **c)** e **d)** fêmea do D1; **e)** e **f)** fêmea do D2; **g)** macho do D3; **h)** e **i)** fêmea do D4; e **j)** conjunto de copépodos do D5. As flechas vermelhas apontam para as deformidades. Concentrações nominais- **Cd:** controle sem 2,4-D; **D1:** 420 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D2:** 480 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D3:** 540 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D4:** 600 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; e **D5:** 660 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. .... 140

**Figura 35.** Isoblograma da mortalidade de *Notodiaptomus iheringi* exposto as misturas de fipronil (Regent 800<sup>®</sup> WG) e 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR). Os dados foram modelados pelos modelos de ação independente/ *independent action* (AI) estendido ao desvio dependente do nível de dose/*dose level-dependent* (DL). As formas côncavas representam o sinergismo e as convexas o antagonismo. Os números sobre as formas representam a razão de mortalidade modelada dos copépodos pelos modelos de desvios..... 144

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas do inseticida fipronil e o herbicida 2,4-D..... 45

**Tabela 2.** Resultados dos modelos lineares misto, linear e linear com variável resposta a abundância de Cladocera, de Copepoda e de Rotífera, respectivamente. AICc - critério de informação de Akaike/ *Akaike information criterion* corrigido para amostras-pequenas;  $\Delta$ AICc – diferença entre o AICcs do modelo com o melhor ajuste e demais modelos; df- graus de liberdade; m – modelo. O modelo com menor AICc e melhor ajuste está destacado em vermelho. .... 116

**Tabela 3.** Valores do coeficiente da estimativa, erro padrão (E.P.), *t*-valor e *p*-valor para os efeitos fixos dos modelos Linear misto, Linear e Linear com abundância de **a)** Cladocera, **b)** Copepoda e **c)** Rotifera como resposta, respectivamente. “\*” = interação. .... 119

**Tabela 4.** Valores iniciais (0 h) das médias e dos desvios padrão (DP) do potencial de hidrogênio (pH), oxigênio dissolvido (OD) e condutividade elétrica (CE), bem como os valores finais das médias e DP (48 h) do pH e OD de todos os tratamentos dos testes de toxicidade aguda dos agrotóxicos isolados. Os tratamentos (T) estão apresentados na tabela como concentração nominal dos agrotóxicos. Para Fipronil (Regent 800<sup>®</sup>WG): **Cr**) controle sem fipronil; **R1**) 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R2**) 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R3**) 6  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R4**) 12  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; e **R5**) 24  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil. Para 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup>BR): **Cd**) controle sem 2,4-D; **D1**) 420  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; **D2**) 480  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; **D3**) 540  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; **D4**) 600  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; e **D5**) 660  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D. .... 131

**Tabela 5.** Valores iniciais (0 h) e finais (48 h) da análise de quantificação química de Fipronil (Regent 800<sup>®</sup>WG) e 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup>BR) no teste agudo dos agrotóxicos isolados. 1, 2 e 3 indicam cada teste de toxicidade aguda realizado com cada um dos agrotóxicos. Tratamentos (T) estão representados na tabela como a concentração nominal dos agrotóxicos. Para Fipronil: **Cr**) controle sem fipronil; **R1**) 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R2**) 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R3**) 6  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R4**) 12  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; e **R5**) 24  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil. Para 2,4-D: **Cd**) controle sem 2,4-D; **D1**) 420  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; **D2**) 480  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; **D3**) 540  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; **D4**) 600  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; e **D5**) 660  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D. O limite de quantificação (LOQ) para Fipronil e 2,4-D foram 0,50 e 5,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. .... 133

**Tabela 6.** Concentrações letais para 10, 20 e 50% (CL<sub>10</sub>, CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>) de *Notodiptomus iheringi* expostos durante 48 h ao Fipronil (Regent 800<sup>®</sup>WG) e a 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup>BR) do teste 1, 2 e 3. Estes valores foram calculados utilizando a concentração quantificada de cada tratamento pela análise de quantificação química. IC é o intervalo de confiança de 95%. Os valores das médias e desvios padrão (DP) de CL<sub>10</sub>, CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub> também constam na tabela..... 134

**Tabela 7.** Valores iniciais (0 h) das médias e dos desvios padrão (DP) do potencial de hidrogênio (pH), oxigênio dissolvido (OD) e condutividade elétrica (CE), bem como os valores finais das médias e DP (48 h) do pH e OD de todos os tratamentos do teste de toxicidade aguda com a mistura dos agrotóxicos. Os tratamentos (T) estão apresentados na tabela como concentração nominal dos agrotóxicos. Para Fipronil (Regent 800<sup>®</sup>WG): **Cr**) controle sem fipronil; **R1**) 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R2**) 3  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R3**) 6  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R4**) 12  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; e **R5**) 24  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil. Para 2,4-D (DMA



806<sup>®</sup> BR): **Cd**) controle sem 2,4-D; **D1**) 420 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D2**) 480 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D3**) 540 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D4**) 600 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; e **D5**) 660 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Para a mistura de Regent 800<sup>®</sup>WG com DMA 806<sup>®</sup> BR: **Cm**) controle sem agrotóxicos; **M1**) R1 com D1; **M2**) R1 com D5; **M3**) R3 com D1; **M4**) R3 com D5; **M5**) R5 com D1; e **M6**) R5 com D5..... 142

**Tabela 8.** Valores finais (48 h) da análise de quantificação química de fipronil (Regent 800<sup>®</sup>WG) e de 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR) no teste agudo da mistura dos agrotóxicos. Tratamentos (T) estão representados na tabela como a concentração nominal dos agrotóxicos: **Cm**) controle sem agrotóxicos;; **R1**) 1,5 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R2**) 3 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R3**) 6 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R4**) 12 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R5**) 24 µg L<sup>-1</sup> de fipronil.; **Cd**) controle sem 2,4-D; **D1**) 420 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D2**) 480 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D3**) 540 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D4**) 600 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D5**) 660 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.; **M1**) R1 com D1; **M2**) R1 com D5; **M3**) R3 com D1; **M4**) R3 com D5; **M5**) R5 com D1; e **M6**) R5 com D5. O limite de quantificação (LOQ) para Fipronil e 2,4-D foram 0,50 e 5,00 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. .... 143

**Tabela 9.** Análise MIXTOX dos efeitos da mistura do fipronil (Regent 800<sup>®</sup> WG) e 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR) na mortalidade de *Notodiptomus iheringi* durante 48 h. Ref = referência; AI = modelo de ação independente/ independent action; AC = modelo de adição de concentração/concentration additionl ; S/A = sinergismo/antagonismo/synergism/antagonism; DL = desvio dependente de nível de dose/ dose level-dependent da referência; DR = desvio dependente da razão de dose/ dose ratio-dependent da referência; Max é o máximo valor de resposta; β= é a inclinação da curva dose-resposta individual; CE<sub>50</sub> = a concentração de efeito mediano; a, b<sub>DR</sub> e b<sub>DL</sub> = parâmetros na função de desvio; SS = soma do quadrado dos resíduos; r<sup>2</sup> = coeficiente de regressão; χ<sup>2</sup> = a estatística de teste; df = graus de liberdade.; p(χ<sup>2</sup>) = o resultado do teste de razão de verossimilhança. .... 145

**Tabela 10.** Valores das médias e dos desvios padrão (DP) da taxa de alimentação (TA) de *Notodiptomus iheringi* do teste de pós-exposição de Fipronil (Regent 800<sup>®</sup> WG) e 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR). 1, 2 e 3 são cada um dos testes de pós-exposição realizados com cada um dos agrotóxicos. Tratamentos (T) estão representados na tabela como a concentração nominal. Para Fipronil: Cr) controle sem fipronil; R1) 1,5 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; R2) 3 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; R3) 6 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; R4) 12 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; e R5) 24 µg L<sup>-1</sup> de fipronil. Para 2,4-D: Cd) controle sem 2,4-D; D1) 420 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; D2) 480 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; D3) 540 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; D4) 600 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; e D5) 660 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. “-“significa que nenhum teste foi desenvolvido com esse tratamento. Valores negativos de taxa de alimentação foram interpretados como zero/nenhuma ingestão (NEJSTGAARD; GISMERVIK; SOLBERG, 1997). .... 148

## LISTA DE APÊNDICES

**Apêndice A1.** Comprimento de onda (CM) da análise de metais, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). ..... 180

**Apêndice A2.** Componentes principais/*principal component* (PC) das variáveis físico e químicas em cada tratamento representada por cada mesocosmo. Tratamento Controle e suas cinco réplicas como mesocosmos C1, C2, C3, C4 e C5: **a)** PC1 versus PC2; e **b)** PC1 versus PC3. Tratamento 2,4-D e suas três réplicas como mesocosmos D1, D2 e D3: **c)** PC1 versus PC2; e **d)** PC1 versus PC3. Tratamento Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos F1, F2 e F3: **e)** PC1 versus PC2; e **f)** PC1 versus PC3. Tratamento da mistura de 2,4-D e Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos M1, M2 e M3: **g)** PC1 versus PC2; e **h)** PC1 versus PC3. As variáveis Cl<sub>b</sub>= clorofila b, Cl<sub>a</sub>= clorofila a e pH= potencial de hidrogênio contribuíram para a PC1. As variáveis OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez contribuíram para a PC2. As variáveis OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez contribuíram para a PC3. “t0”, “t14” e “t73” são os dias 0, 14, e 73 da coleta referente ao dia da contaminação (0 dias). “+” significa que a PC está relacionada positivamente a variável. “-” significa que a PC está relacionada negativamente a variável..... 181

**Apêndice A3** Componentes principais/*principal component* (PC) dos nutrientes em cada tratamento representada por cada mesocosmo. Tratamento Controle e suas cinco réplicas como mesocosmos C1, C2, C3, C4 e C5: **a)** PC1 versus PC2; **b)** PC1 versus PC3; e **c)** PC1 versus PC4. Tratamento 2,4-D e suas três réplicas como mesocosmos: D1, D2 e D3: **d)** PC1 versus PC2; **e)** PC1 versus PC3; e **f)** PC1 versus PC4. Tratamento Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos F1, F2 e F3: **g)** PC1 versus PC2; **h)** PC1 versus PC3; e **i)** PC1 versus PC4. Tratamento da mistura de 2,4-D e Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos M1, M2 e M3: **j)** PC1 versus PC2; **k)** PC1 versus PC3; e **l)** PC1 versus PC4. As variáveis PI= fosfato inorgânico, PTD= fosfato total dissolvido e PT= fósforo total contribuíram para a PC1. As variáveis NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, NH<sub>4</sub>= íon amônio, PT e SiO<sub>2</sub>= silicato reativo contribuíram para a PC2. As variáveis NO<sub>2</sub>= nitrito, NO<sub>3</sub>= nitrato e NH<sub>4</sub> contribuíram para a PC3. As variáveis PTD, SiO<sub>2</sub>, PT e NTK contribuíram para a PC4. “t0”, “t14” e “t73” são os dias 0, 14 e 73 da coleta referente ao dia da contaminação (0 dias). “+” significa que a PC está relacionada positivamente a variável. “-” significa que a PC está relacionada negativamente a variável..... 182

**Apêndice A4.** Componentes principais/*principal component* (PC) dos metais em cada tratamento representada por cada mesocosmo. Tratamento Controle e suas cinco réplicas como mesocosmos C1, C2, C3, C4 e C5: **a)** PC1 versus PC2 e **b)** PC1 versus PC3. Tratamento 2,4-D e suas três réplicas como mesocosmos: D1, D2 e D3: **c)** PC1 versus PC2; e **d)** PC1 versus PC3. Tratamento Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos F1, F2 e F3: **e)** PC1 versus PC2; e **f)** PC1 versus PC3. Tratamento da mistura de 2,4-D e Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos M1, M2 e M3: **g)** PC1 versus PC2; e **h)** PC1 versus PC3. As variáveis Mn=manganês, Ba= bário, Sr= estrôncio, K= potássio e Cu= cobre contribuíram para a PC1. As variáveis Pb= chumbo, Ni= níquel, Zn= zinco, Co= cobalto e Mo= molibdênio contribuíram para a PC2. As variáveis Zn, Ni, Mo, Co e Cd= cádmio contribuíram para a PC3. “t0”, “t14” e “t73” são os dias 0, 14 e 73 da coleta referente ao dia da contaminação (0 dias). “+” significa que a PC está relacionada positivamente a variável. “-” significa que a PC está relacionada negativamente a variável. .... 184

**Apêndice B1.** Gráficos dos resíduos do modelo linear misto final (modelo com menor critério de informação de Akaike/ *Akaike information criterion* corrigido para amostras-pequenas (AICc)) da variável resposta abundância de Cladocera: *residuals versus theoretical quantiles*= gráfico envelope da probabilidade da normalidade dos resíduos; e *residuals versus index*= resíduos versus valores dos resíduos ajustado para a observação da heterocedasticidade dos resíduos. .... 187

**Apêndice B2.** Gráficos dos resíduos do modelo linear final (modelo com menor critério de informação de Akaike/ *Akaike information criterion* corrigido para amostras-pequenas (AICc)) da variável resposta abundância de Copepoda: *residuals versus theoretical quantiles*= gráfico envelope da probabilidade da normalidade dos resíduos; e *residuals versus index*= resíduos versus valores dos resíduos ajustado para a observação da heterocedasticidade dos resíduos. .... 187

**Apêndice B3.** Gráficos dos resíduos do modelo linear final (modelo com menor critério de informação de Akaike/ *Akaike information criterion* corrigido para amostras-pequenas (AICc)) da variável resposta abundância de Rotifera: *residuals versus theoretical quantiles*= gráfico envelope da probabilidade da normalidade dos resíduos; e *residuals versus index*= resíduos versus valores dos resíduos ajustado para a observação da heterocedasticidade dos resíduos. .... 188

**Apêndice B4.** Processo da modelagem da significância dos efeitos das variáveis fixas e aleatórias na abundância ( $\log(\text{abundance}+1)$ ) de Cladocera, de Copepoda de Rotifera. Para a abundância de Cladocera o modelo linear misto foi aplicado. Para as abundâncias tanto de Copepoda quanto de Rotifera os modelos lineares foram aplicados. Os efeitos fixos foram: T- Tratamento; C –  $\log(\text{comunidade}+1)$ ; 1 – PC1; 2- PC2; 3-PC3; 4-PC4; D- Dias; e as interações –“\*””. Os efeitos aleatórios foram: RD – Dias; e RM – Mesocosmo. “0” representa a retirada da variável do modelo. Os modelos em vermelho representam os modelos com melhores ajustes (modelo final). As variáveis em cada modelo seguiram uma ordem de significância, a qual foi testada. .... 188

## SUMÁRIO

<i>Apresentação da tese</i> .....	xvi
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	1
<i>1.1 Agrotóxicos e suas implicações no sistema aquático</i> .....	2
<i>1.2 Ecotoxicologia e avaliação dos efeitos dos agrotóxicos na comunidade zooplânctonica</i> .....	4
<i>1.3 Ecotoxicologia e modelos ecossistêmicos</i> .....	12
<i>1.4 Justificativa</i> .....	14
2 OBJETIVOS E HIPÓTESES .....	16
<i>2.1 Objetivo geral</i> .....	16
<i>2.2 Objetivos específicos</i> .....	16
<i>2.3 Hipóteses</i> .....	16
3 REFERÊNCIAS .....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
<i>4.1 Agrotóxicos utilizados no estudo</i> .....	43
<b>4.2 CAPÍTULO 1: IMPACTOS NA QUALIDADE DA ÁGUA DEVIDO AO USO DE AGROTÓXICOS EM CULTIVOS DE CANA-DE-AÇÚCAR: O QUE UM EXPERIMENTO EM MESOCOSMOS PODE RESPONDER</b> .....	47
4.2.1 Design experimental .....	47
4.2.2 Aplicação dos agrotóxicos .....	52
4.2.3 Variáveis abióticas e climatológicas .....	53
4.2.4 Análises estatísticas .....	54
<b>4.3 CAPÍTULO 2: COMUNIDADE ZOOPLÂNCTONICA COMO BIOINDICADORA DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE 2,4-D E FIPRONIL, ISOLADOS E EM MISTURA</b> .....	56
4.3.1 Análises estatísticas .....	56
<b>4.4 CAPÍTULO 3: OS EFEITOS AGUDOS DE FIPRONIL E 2,4-D, ISOLADOS E EM MISTURA: UMA AMEAÇA AO COPÉPODE CALANOIDA DE ÁGUA DOCE <i>Notodiptomus iheringi</i></b> .....	58
4.4.1 Manutenção e Cultivo do organismo-teste <i>Notodiptomus iheringi</i> ..	58
4.4.2 Preparação das soluções de agrotóxicos e medidas das variáveis físicas e químicas .....	60
4.4.3 Testes de toxicidade com os agrotóxicos isolados .....	61
4.4.4 Teste de toxicidade com a mistura dos agrotóxicos .....	61
4.4.5 Teste de pós-exposição .....	63
4.4.6 Quantificação química .....	64

4.4.7 Análises estatísticas.....	64
5 REFERÊNCIAS .....	65
6 RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	74
<b>6.1 CAPÍTULO 1: IMPACTOS NA QUALIDADE DA ÁGUA DEVIDO AO USO DE AGROTÓXICOS EM CULTIVOS DE CANA-DE-AÇÚCAR: O QUE UM EXPERIMENTO EM MESOCOSMOS PODE RESPONDER .....</b>	<b>75</b>
6.1.1 Variáveis climatológicas durante o período de estudo.....	75
6.1.2 Quantificação dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil nos mesocosmos .....	76
6.1.3 Variáveis físicas, químicas e biológicas (clorofila a e feofitina) .....	77
6.1.4 Quantificação dos nutrientes nitrogenados e fosfatados nos mesocosmos .....	82
6.1.5 Quantificação dos metais nos mesocosmos .....	88
6.1.6 Discussão.....	94
6.1.7 Conclusão .....	106
<b>6.2 CAPÍTULO 2: COMUNIDADE ZOOPLÂNTONICA COMO BIOINDICADORA DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE 2,4-D E FIPRONIL, ISOLADOS E EM MISTURA .....</b>	<b>107</b>
6.2.1 Caracterização limnológica dos mesocosmos .....	107
6.2.2 Efeito dos agrotóxicos na densidade de Cladocera, Copepoda e Rotífera.....	111
6.2.3 Variação na densidade dos organismos entre réplicas em experimentos com mesocosmos.....	126
6.2.4 Conclusão .....	129
<b>6.3 CAPÍTULO 3: OS EFEITOS AGUDOS DE FIPRONIL E 2,4-D, ISOLADOS E EM MISTURA: UMA AMEAÇA AO COPÉPODA CALANOIDA DE ÁGUA DOCE <i>Notodiptomus iheringi</i>.....</b>	<b>131</b>
6.3.1 Teste de toxicidade com os agrotóxicos isolados.....	131
6.3.2 Teste de toxicidade com a mistura dos agrotóxicos .....	141
6.3.3 Testes de pós-exposição .....	147
6.3.4 Conclusão .....	149
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	149
8 REFERÊNCIAS .....	155
APÊNDICE A .....	179
APÊNDICE B.....	186

## *Apresentação da tese*

Esta tese de doutorado foi elaborada de forma a atender as normas estabelecidas para apresentação das dissertações e teses na Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo. Para melhor compreensão da estruturação da tese, a mesma está subdividida em:

**Introdução e revisão bibliográfica, Justificativa, Objetivos e Hipóteses:** nesta seção foi feita uma breve introdução do tema desenvolvido na tese, com uma revisão bibliográfica relacionada aos principais tópicos abordados na pesquisa. Incluiu-se, ainda, uma justificativa da pesquisa, juntamente com os objetivos e as principais hipóteses delineadores da tese. Ao final desta seção foram incluídas as referências bibliográficas mencionadas no texto.

**Material e métodos:** no item Material e Métodos foram incluídas todas as etapas da pesquisa, as quais estão subdivididas em Capítulos que subsidiarão a análise dos resultados e discussão. Assim, este item contempla informações metodológicas das pesquisas desenvolvidas para a análise dos: Capítulo 1 - **“Impactos na qualidade da água devido ao uso de agrotóxicos em cultivos de cana-de-açúcar: o que um experimento em mesocosmos pode responder”**; Capítulo 2- **“Comunidade zooplânctonica como bioindicadora dos efeitos ecotoxicológicos de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, em ecossistemas aquáticos”**; e por último Capítulo 3 - **“Os efeitos agudos de fipronil e 2,4-D, isolados e em mistura: uma ameaça ao copépode Calanoida de água doce *Notodiaptomus iheringi*”**. Ao final desta seção também foram incluídas as referências bibliográficas utilizadas para o desenvolvimento da pesquisa.

**Resultados e discussão, Conclusão e Considerações finais:** nesta seção foram apresentados os resultados e discussão dos principais “achados” desta pesquisa, seguindo a mesma base da apresentação metodológica, com subdivisão em três capítulos (**“Impactos na qualidade da água devido ao uso de agrotóxicos em cultivos de cana-de-açúcar: o que um experimento em mesocosmos pode responder”**, da **“Comunidade zooplânctonica como bioindicadora dos efeitos ecotoxicológicos de 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, em ecossistemas aquáticos”** e por último **“Os efeitos agudos de fipronil e 2,4-D, isolados e em mistura: uma ameaça ao copépode Calanoida de água doce *Notodiaptomus iheringi*”**). Adicionalmente estão incluídas as conclusões e considerações gerais, nas quais é apresentada uma síntese de toda a pesquisa. Por último estão as referências bibliográficas e os apêndices/anexos (tabelas, figuras, etc).

## **1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Agrotóxicos e suas implicações no sistema aquático**

Desde a ‘Revolução Verde’ o uso de agrotóxicos no setor agrícola, a fim de expandir a produção, tem aumentado significativamente no mundo (JACOBI *et al.*, 2016), sendo que no Brasil, esse processo de modernização na agricultura aconteceu nas décadas de 1960 e 1970 (CNAPO, 2014). Este período coincidiu com uma crise mundial no setor petrolífero, fazendo do pacote tecnológico, o qual incluía os agrotóxicos, uma ferramenta para que o Brasil aumentasse a produção de cana-de-açúcar, para a geração de etanol como biocombustível (LEITE; LEAL, 2007; PATZEK, 2008; MAPA, 2009). O Brasil ainda segue investindo no etanol produzido a partir da cana-de-açúcar, entretanto com uma preocupação mais atrelada a redução da emissão de gás carbônico causado pelo uso de combustíveis fósseis (DIAS *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2016; MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

Consequentemente, houve uma intensificação da aplicação de agrotóxicos nesses cultivos, a fim de melhorarem ou expandirem a produção (PERES; ROZEMBERG; LUCCA, 2005). Em 2021, 389 ingredientes ativos de agrotóxicos foram comercializados no Brasil para uso agrícola (IBAMA, 2023a). Em 2022, 3.120 produtos formulados foram registrados para venda no mercado (AGROFIT, 2023a) e desses, 120 ingredientes ativos e 803 produtos formulados estão registrados para o uso em cultivo da cana-de-açúcar (AGROFIT, 2023b). As classes de uso desses produtos são: inseticidas; fungicidas; herbicidas; nematicidas; acaricidas; moluscicidas; formicidas; protetor de sementes; adjuvante; espalhante; cupinicida; bactericida; e regulador de crescimento, sendo que os herbicidas, em 2021, representaram 56,63% da venda para a agricultura como um todo, seguidos pelos fungicidas (17,90%) e inseticidas (12,87%) (IBAMA, 2023b).

O Estado de São Paulo além de ser o segundo estado do Brasil que mais consome agrotóxicos (IBAMA, 2023b), também se destaca como aquele onde se concentra a maior parte do plantio da cana-de-açúcar nacional e da produção de etanol (CONAB, 2023; UNICA, 2023). De acordo com dados do Instituto de Economia Agrícola-IEA, com base na relação de troca defensivos - produtos agrícolas, os ingredientes ativos empregados no cultivo dessa monocultura no estado de São Paulo, de 2010 à 2016, foram os mesmos: 2,4-D amina; clomazona; ametrina; imazapique; isoxaflutole; hexazinona+diuron; MSMA; fipronil e etil-trinexapac. Com exceções do endosulfan e ethephon, os quais



foram utilizados no período de 2010-2011 e imidacloprido utilizado de 2011-2016 (IEA, 2023).

Contudo, o uso elevado, frequente e também incorreto dos agrotóxicos tem acarretado em impactos nos ambientes aquáticos próximos das áreas agrícolas (SPADOTTO, 2006), comprometendo a qualidade das águas e causando efeitos negativos nos organismos que aí vivem (SPADOTTO, 2006). As aplicações de agrotóxicos para controle de pragas nos cultivos de cana-de-açúcar, no Brasil, geralmente ocorrem nos períodos chuvosos (CORREIA; BRAZ; FUZITA, 2010; DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; SANTAROSSA, 2017), o que favorece o transporte dos mesmos via escoamento superficial ou percolação, os quais acabam atingindo as águas superficiais e os lençóis freáticos (BORTOLOZO *et al.*, 2016). Uma vez no ambiente aquático, através de vários processos químicos e físicos, os agrotóxicos podem se ligar a materiais particulados suspensos e assim depositarem-se ao sedimento (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008), impactando esse compartimento, bem como degradando sua qualidade (WARREN *et al.*, 2003). Além disso, esses contaminantes podem retornar a coluna d'água devido a mudanças no ambiente, tornando-se biodisponíveis aos organismos que vivem nessa matriz (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Em vários estados do Brasil, resíduos de agrotóxicos acima do limite de detecção já foram encontrados na água, sendo o fipronil o contaminante encontrado com maior frequência (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016), o qual também já foi verificado em sedimentos de ambientes aquáticos (BOBÉ; COSTE; COOPER, 1997; HINTZEN; LYDY; BELDEN, 2009; PERET *et al.*, 2010). O fipronil é um inseticida do grupo fenilpirazóis e um ingrediente ativo (i.a.) da formulação comercial Regent® 800 WG (contendo 80% (m m<sup>-1</sup>) ou 800 g kg<sup>-1</sup> do i.a. fipronil) (ADAPAR, 2020a), agindo no sistema nervoso central de insetos e inibindo a função do receptor do ácido gama  $\gamma$ -aminibutírico (GABA). De forma resumida, o fipronil interrompe o influxo neural normal tendo como alvo o canal de cloreto, o qual é controlado pelo GABA, assim, quando GABA é bloqueado por fipronil há uma superexcitação neural, levando o organismo a morte (COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993). Esta molécula se degrada no ambiente por oxidação, redução, hidrólise e fotólise, resultando nos subprodutos fipronil sulfone, fipronil sulfide, fipronil amide (BOBÉ *et al.*, 1998) e fipronildesulfinil (KONWICK *et al.*, 2005), respectivamente.

Outro agrotóxico que merece destaque é o herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), não apenas por ter sido detectado em águas superficiais (PINHEIRO; SILVA; KRAISCH, 2010), mas também por ser o segundo agrotóxico mais comercializado no Brasil (IBAMA, 2020). O mesmo é considerado um herbicida seletivo de ação sistêmica do grupo do ácido ariloxialcanoico, agindo por imitação do hormônio de crescimento auxina em nível molecular, eliminando as dicotiledôneas sem afetar as monocotiledôneas (SONG, 2014), como também é o i. a. da formulação comercial DMA<sup>®</sup> 806 BR (contendo 80,6% (m v<sup>-1</sup>) ou 806 g L<sup>-1</sup> do i.a.2,4-D) (ADAPAR, 2020b), sendo o seu principal produto de degradação o 2,4-diclorofenol.

Entretanto, a ação tóxica desses compostos não é restrita apenas aos organismos alvos, pois a toxicidade acaba sendo exercida também em organismos não alvos (CARVALHO, 2017), bem como os subprodutos desses agrotóxicos podem apresentar o potencial de serem mais tóxicos a biota que a molécula original (CHAVES, 2017; MARTINS; OLIVA TELES; VASCONCELOS, 2007; US EPA, 1996). Além disso, muitos estudos enfatizam a necessidade de se realizar estudos ecotoxicológicos utilizando as formulações comerciais, por serem eles os produtos aplicados diretamente no ambiente, e também por conterem outros compostos adicionados, como surfactantes e os ingredientes conhecidos como inertes com o objetivo de aumentarem a eficácia química e física dos ingredientes ativos como agrotóxicos (US EPA, 2018a), os quais podem alterar significativamente a toxicidade do agrotóxico às espécies presentes (BEGGEL *et al.*, 2010; COX; SURGAN, 2006; CUHRA; TRAAVIK; BØHN, 2013; MANSANO *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2018). Portanto, é importante que estes impactos sejam avaliados como uma forma de ampliar a conservação dos ecossistemas, uma vez que informações relacionadas à toxicidade de agrotóxicos ao zooplâncton de águas doces ainda são mais limitadas (RICO-MARTÍNEZ *et al.*, 2012), e um impacto direto e negativo por um contaminante em uma espécie chave pode gerar efeitos em muitas comunidades através das interações biológicas (HANAZATO, 2001).

## ***1.2 Ecotoxicologia e avaliação dos efeitos dos agrotóxicos na comunidade zooplânctonica***

Um importante grupo de organismos dos ecossistemas aquáticos é o zooplâncton, o qual desempenha um papel ecológico relevante na dinâmica desses ambientes, através

do fluxo de energia e na ciclagem de nutrientes, já que por se alimentarem do fitoplâncton formam um elo entre os produtores primários e os níveis tróficos superiores (PANE *et al.*, 2012). Os principais componentes do zooplâncton de água doce são os cladóceros, copépodos, rotíferos e protozoários (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2017), sendo estes organismos considerados sensíveis as mudanças ambientais e ótimos bioindicadores das condições em que se encontra o ecossistema (ESTEVES; SENDACZ, 1988; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2005; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI; ROCHA, 2002; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2017). Assim, a presença e a longa persistência de muitos agrotóxicos nos ambientes de água doce são capazes de produzirem efeitos adversos à população zooplanctônica (NEWBOLD, 1975).

Uma forma bastante utilizada para analisar os impactos devido aos agrotóxicos tem sido por meio da utilização de dados de toxicidade obtidos nos testes laboratoriais (ANTUNES; CASTRO; GONÇALVES, 2004; COORS; HAMMERS-WIRTZ; RATTE, 2004), os quais podem ser tanto agudos, que mensuram os efeitos de agentes tóxicos (letalidade) nos organismos em um curto período de tempo quando relacionado ao período de vida do organismo-teste; quanto crônicos, que medem os efeitos subletais (como na reprodução, desenvolvimento, crescimento, dentre outros) que as substâncias químicas podem causar em espécies aquáticas durante parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990). Estudos têm demonstrado que agrotóxicos, como os inseticidas, causam toxicidade aguda em várias espécies de organismos de água doce e marinha, sendo os crustáceos os mais sensíveis a estes compostos (BAYLEY; BAATRUP, 1996; COORS; HAMMERS-WIRTZ; RATTE, 2004). Dentre os crustáceos, os copépodos representam um importante grupo do mesozooplâncton devido à sua abundância, biomassa e diversidade (RUPPERT; BARNES, 1996), e são considerados os metazoários mais numerosos na terra (MARTIN, 1970). Em geral, rotíferos são, em termos de número de indivíduos, os mais abundantes no zooplâncton de água doce, entretanto, em alguns lagos, Copepoda é o grupo de organismos que mais contribui em termos de biomassa (MATSUMURA-TUNDISI; RIETZLER; TUNDISI, 1989; PEDERSON; WELCH; LITT, 1976; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2017), podendo atingir cerca de 80% da biomassa zooplanctônica (MATSUMURA-TUNDISI; RIETZLER; TUNDISI, 1989).

A subclasse Copepoda (filo Arthropoda, subfilo Crustacea e classe Maxillopoda) é composta por um total de dez ordens, em que as ordens Calanoida, Cyclopoida e

Harpacticoida são as dominantes (BRON *et al.*, 2011), estando presente em uma variedade de habitats aquáticos, desde água em folhas de bromélia (POR; HADEL, 1986), águas subterrâneas (HOSE *et al.*, 2016), lagos (ESPÍNDOLA, 1994; KULKARNI *et al.*, 2013; OKUMURA, 2011) e oceanos (LOPES; AGOSTINI; MUXAGATA, 2018; MEDINA *et al.*, 2002), além de ser encontrada tanto nos compartimentos pelágicos quanto bentônicos do ambiente aquático (BEAUGRAND *et al.*, 2003; BRON *et al.*, 2011; RAISUDDIN *et al.*, 2007). Ainda, os copépodos preenchem uma diversidade de nichos ecológicos, incluindo organismos herbívoros (ESPÍNDOLA, 1994; LOPES; AGOSTINI; MUXAGATA, 2018; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2017), detritívoros (GOWING; WISHNER, 1986), omnívoros (OHTSUKA; ONBÉ, 1991; TURNER, 1987), carnívoros (BRANDL; FERNANDO, 1978; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2017; VESTHEIM; KAARTVEDT; EDVARDESEN, 2005), simbióticos (HUMES, 1996), além de formas parasitas (ANSTENSRUD, 1990). Estes organismos se reproduzem sexualmente e apresentam um desenvolvimento do ovo ao estágio adulto incluindo seis formas naupliares (I-VI) e cinco estágios de copepodito (I-VI), em que o estágio adulto é o copepodito VI (OKUMURA, 2011; WILLIAMSON; REID, 2001). O desenvolvimento dos copépodos é rápido, requerendo alguns dias a algumas semanas para se tornarem sexualmente maduros, com o tempo do ciclo de vida dependente da espécie (BRETELER; FRANSZ; GONZALEZ, 1982), da temperatura (DEVREKER; SOUSSI; SEURONT, 2004; ESPÍNDOLA, 1994; SOUSSI; CARLOTTI; NIVAL, 1997), da salinidade (DEVREKER; SOUSSI; SEURONT, 2004), da alimentação (BRETELER; FRANSZ; GONZALEZ, 1982; ESPÍNDOLA, 1994; SOUSSI; CARLOTTI; NIVAL, 1997) e da densidade populacional (ZHANG; UHLIG, 1993).

A sensibilidade dos copépodos à substâncias químicas como os agrotóxicos (JONES; HUA; RELYEA, 2016; LEGRAND *et al.*, 2017; MEDINA *et al.*, 2002; VAN WIJNGAARDEN *et al.*, 2006), os metais (GORBI *et al.*, 2012; HEUSCHELE *et al.*, 2022; HOOK; FISHER, 2002) e o petróleo bruto (DE HOOP *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2017) já foi comprovada, e por serem presas naturais de muitas larvas de espécies de peixes (STØTTRUP *et al.*, 1986) apresentam o potencial de transferirem substâncias tóxicas através da cadeia trófica (FAVARI *et al.*, 2002). Existem cerca de 13.000 espécies de copépodos (BOXSHALL; DEFAYE, 2008; HOOFF; PETERSON, 2006), sendo que dessas espécies 2.814 vivem no ambiente de água doce (BOXSHALL; DEFAYE, 2008). Entretanto, poucas são as espécies que foram padronizadas para testes de toxicidade, e as

que foram pertencem ao ambiente marinho (*Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco 1972, *Nitocra spinipes* Boeck, 1865 e *Acartia tonsa* Dana 1829) (ISO 14669, 1999).

Nos testes de toxicidade de água doce os organismos mais utilizados são os cladóceros, enquanto os copépodos foram utilizados com menor frequência (CALOW, 1998). Em uma pesquisa prévia realizada no período de 2008 à 2018, verificou-se que foram publicados somente 127 artigos com ênfase no uso de copépodos em análises ecotoxicológicas (revisão bibliográfica utilizando o banco de dados do SciVerse Scopus® com as palavras chave *copepod\* and ecotoxicology*), sendo que das 41 espécies, 22 eram de ambiente marinho, 11 de água doce, 7 estuarinas e 1 subterrânea, pertencentes às ordens Calanoida (15), Cyclopoida (11) e Harpacticoida (14). As espécies *Tigriopus japonicus* Mori 1938 (Harpacticoida, com 17), *A. tonsa* (Calanoida, com 15) e *Calanus finmarchicus* Gunnerus 1770 (Calanoida, com 12) foram as mais utilizadas nos testes de toxicidade. A título de comparação, no mesmo período, verificou-se que para o gênero *Daphnia* foram publicados 974 artigos (revisão bibliográfica utilizando o banco de dados do SciVerse Scopus® com as palavras chave *Daphnia\* and ecotoxicology*). Segundo KULKARNI *et al.* (2013), as publicações raramente mencionam *Daphnia* como cladóceros e assumem que os leitores já apresentam esse conhecimento.

Outro exemplo da subutilização de copépodos em testes de toxicidade é em relação à Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), que para avaliar a qualidade da água incluiu testes de toxicidade tanto agudo quanto crônico com organismos do zooplâncton, mas nenhum destes testes utiliza copépodos (CETESB, 1991, 1994a, 1994b). Entretanto, quando se observa a concentração letal a 50% dos organismos (CL<sub>50</sub>) aos agrotóxicos, muitas espécies de copépodos apresentaram uma CL<sub>50</sub> menor a certos agrotóxicos em relação a CL<sub>50</sub> da espécie padronizada *D. magna* Straus 1820 (US EPA, 2018b), sendo as espécies *T. brevicornis* Müller 1776 (FORGET *et al.*, 1999), *Thermocyclops taihokuensis* Harada 1931, *Mesocyclops pehpeiensis* Hu 1943 e *Eodiaptomus Japonicus* Burckhardt 1913 (TAKAHASHI; CHANG; HANAZATO, 2006), mais sensíveis ao inseticidas do grupo carbamato (carbofuran, carbaril, carbaril e carbaril, respectivamente); *M. leuckarti* Claus 1857 (SHARMA *et al.*, 2014), *Diaptomus forbesi* Light 1938 (SAHA; KAVIRAJ, 2008), *T. battagliai* (BARATA *et al.*, 2002), *Cyclops viridis* Jurine 1820 (MAJUMDER; KAVIRAJ, 2015), *A. tonsa* (MEDINA *et al.*, 2002), *Oithona similis* Claus 1866, *Temora longicornis* Müller 1785, *A. clausi* Giesbrecht 1889, *Pseudocalanus elongatus* Boeck

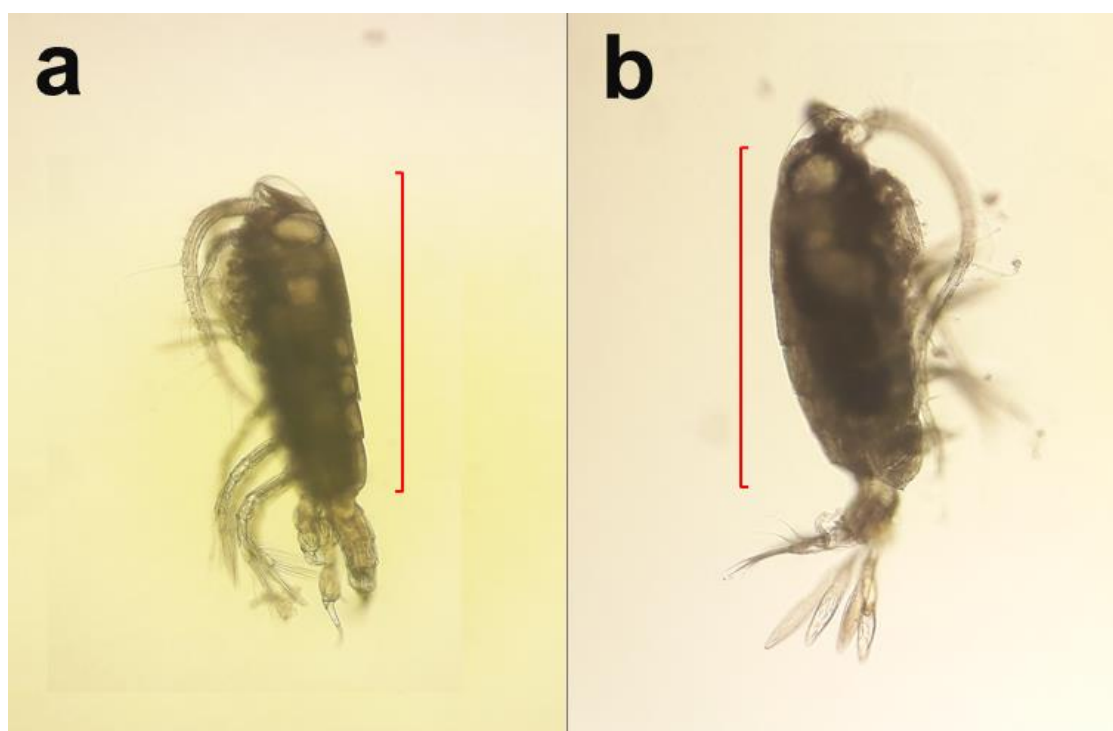
1865 (WILLIS; LING, 2004) e *Acanthocyclops robustus* Sars 1863 (HOUSSOU; DANGUÉGUÉ; MONTCHOWUI, 2017) mais sensíveis ao inseticida cipermetrina, do grupo dos piretróides; e por fim *A. tonsa* (KUSK; WOLLENBERGER, 2005), *Amphiascus tenuiremis* Brady 1880 (CHANDLER *et al.*, 2004), *D. castor* Jurine 1820, *A. robustus* (CHATON *et al.*, 2002), *Eurytemora affinis* Nordquist 1888 e *Pseudodiaptomus forbesi* Poppe e Richard 1890 (TEH; LESMEITER; HAMMOCK, 2013) mais sensíveis ao inseticida fipronil.

Algumas características são requeridas para que uma espécie seja adequada para o uso como organismo-teste na ecotoxicologia, incluindo uma ampla distribuição geográfica, sensibilidade, facilidade de cultivo, ciclo de vida curto, produção de grandes descendentes e a existência de uma quantidade considerável de informações sobre a espécie (ABNT, 2017; GORBI *et al.*, 2012; ISO 14669, 1999; RAISUDDIN *et al.*, 2007). Logo, devido à importância ecológica dos copépodos, o uso dos mesmos como organismo-teste em experimentos ecotoxicológicos é uma vantagem, já que um banco de dados em relação à biologia de muitas espécies desse grupo está disponível, como informações do ciclo de vida natural, dieta, morfologia, comportamento, além da tolerância as variáveis ambientais (RAISUDDIN *et al.*, 2007).

O copépode Calanoida *Notodiaptomus iheringi* Wright S 1935 (Figura1) é considerado um importante componente de ambientes límnicos da região de São Paulo (MATSUMURA-TUNDISI; RIETZLER; TUNDISI, 1989; OKUMURA, 2011; RIETZLER; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2002), e atende aos requisitos para ser um organismos-teste. *N. iheringi* apresenta uma grande distribuição no hemisfério sul entre as latitudes 5° S à 25 °S (MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2003). Além disso, existe muita informação quanto à biologia e ecologia desta espécie (MATSUMURA-TUNDISI; GALIZIA TUNDISI, 2003; OKUMURA, 2011; RIETZLER; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2002; ROCHA; MATSUMURA-TUNDISI, 1984), sendo *N. iheringi* conhecida por estar associada com ambientes eutrofizados, com alta turbidez, alta condutividade e baixa concentrações de oxigênio dissolvido. (RIETZLER; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2002).

Sabe-se que a maioria das espécies de copépodos Calanoidas é bastante sensível as pequenas variações ambientais, especialmente mudanças na condutividade e na composição iônica do sistema (MATSUMURA-TUNDISI; GALIZIA TUNDISI, 2003) e devido a esta baixa tolerância em muitos fatores ambientais (principalmente, parâmetros

físicos e químicos) acaba resultando em um forte endemismo dessas espécies, em que a maioria dos gêneros registrados no hemisfério sul não ocorre no hemisfério norte (MATSUMURA-TUNDISI; GALIZIA TUNDISI, 2003). Entretanto, muitos critérios de qualidade de água estabelecidos em regiões tropicais se baseiam em bioensaios ecotoxicológicos utilizando espécies exóticas como organismos-teste (MANSANO; OLIVEIRA; ROCHA, 2012), e isto pode acarretar em erros já que a resposta de cada organismo ao contaminante é específica da espécie. Portanto, espécies não nativas acabam por não representarem apropriadamente os efeitos dos contaminantes na biota local por não disporem de uma relevância ecológica nesses ecossistemas (HONG; SLOOTEN; TARRADELLAS, 2004; MANSANO; OLIVEIRA; ROCHA, 2012; OKUMURA, 2011).



**Figura 1.** Fotografia de *Notodiaptomus iheringi*. As barras em vermelho indicam a estrutura do prossoma do copépodo. **a)** macho (comprimento do prossoma  $1,03 \pm 0,02 \mu\text{m}$  (OKUMURA, 2011)) e **b)** fêmea (comprimento do prossoma  $1,47 \pm 0,07 \mu\text{m}$  (OKUMURA, 2011)). Foto: Laís Fernanda de Palma Lopes.

Nos ecossistemas os contaminantes ocorrem simultaneamente em misturas, as quais variam ao longo do tempo em concentração e em composição (HERBRANDSON; BRADBURY; SWACKHAMER, 2003), devido a constante entrada de substâncias químicas por diferentes fontes (*i.e.* agricultura, indústria, atividades urbanas, etc.) nesses sistemas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; CHANDER *et al.*, 2016; FERREIRA;

LOUREIRO; SOARES, 2008; MEFFE; DE BUSTAMANTE, 2014; SHRAIM *et al.*, 2017). Entretanto, a combinação de seus efeitos aos organismos que vivem no ambiente é pouco estudada, sendo que a maior parte dos estudos avalia os efeitos de contaminantes isolados (BARATA *et al.*, 2006; WENDT-RASCH *et al.*, 2003). Existem evidências de que no ambiente natural o zooplâncton é mais sensível aos agrotóxicos do que quando cultivados em laboratório em condições controladas (BARATA *et al.*, 2006; LUGO *et al.*, 1998), e isto acontece porque no ecossistema a comunidade aquática, além de estar sujeita a modificar sua sensibilidade quando exposta aos agrotóxicos devido a estressores naturais, como por exemplo predação (PESTANA *et al.*, 2009) e flutuação de fatores abióticos (FERREIRA; LOUREIRO; SOARES, 2008), também está inserida em um meio composto por misturas de componentes químicos e não apenas a um contaminante isolado (HERBRANDSON; BRADBURY; SWACKHAMER, 2003).

Ainda, as misturas dos contaminantes podem desencadear efeitos aditivos, antagônicos (menos severos), ou também sinérgicos (mais severos) (HERBRANDSON; BRADBURY; SWACKHAMER, 2003; LIU *et al.*, 2013; MAGNUSSON *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2017). Muitos desses efeitos vem sendo relatados em testes de toxicidade que adotaram diferentes espécies do zooplâncton como organismo-teste (BAILEY *et al.*, 1997; BARATA *et al.*, 2006; LEGRAND *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2013; PAVLAKI *et al.*, 2011; PHYU *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015). Dentre estes estudos, diferentes respostas (letalidade (BAILEY *et al.*, 1997; BARATA *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2017); alimentação (BARATA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2015); e reprodução (PAVLAKI *et al.*, 2011; PHYU *et al.*, 2011)) foram utilizadas como parâmetros para avaliar os efeitos tóxicos das misturas de diferentes agrotóxicos (BAILEY *et al.*, 1997; BARATA *et al.*, 2006; LEGRAND *et al.*, 2017; MOREIRA *et al.*, 2017; PAVLAKI *et al.*, 2011; PHYU *et al.*, 2011), de agrotóxico com metal (BARATA *et al.*, 2006; PAVLAKI *et al.*, 2011) e de agrotóxico com fármaco (SILVA *et al.*, 2015).

Em relação aos copépodos, embora haja pouca informação da toxicidade de misturas de agrotóxicos a esses organismos, a mesma sugere que a combinação desses compostos, por exemplo, herbicidas, causa um efeito potencializado (efeito sinérgico), tornando-os um risco ainda maior a esses microcrustáceos (LEGRAND *et al.*, 2017).

Assim, com o objetivo de se avaliar o efeito tóxico das misturas dois modelos conceituais foram estabelecidos, o de adição de concentração/*concentration addition* (AC) e de ação independente/*independent action* (AI), verificando desvios que são



referidos como sinergismo ou antagonismo, dependente do nível de dose/ *dose level-dependent* e dependente da razão de dose/*dose ratio-dependent* (JONKER *et al.*, 2005). A escolha para se utilizar um dos modelos se baseia no modo de ação de cada contaminante, isto é, se os contaminantes apresentam modo de ação similares no organismo, então o modelo AC é o mais adequado, por outro lado se os contaminantes diferem no modo de ação, logo o modelo AI é o recomendado (JONKER *et al.*, 2005) e, quando o modo de ação dos contaminantes é desconhecido os dois modelos podem ser utilizados, sendo que o modelo que melhor se ajustar aos dados é o que deve ser escolhido (JONKER *et al.*, 2005; PAVLAKI *et al.*, 2011).

Entretanto, mesmo sabendo da importância de se avaliar os efeitos ecotoxicológicos de misturas de agrotóxicos aos organismos (BARATA *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2017; PHYU *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015), existe uma escassez de estudos avaliando a toxicidade da mistura de fipronil e 2,4-D a biota. Até 2018, não haviam trabalhos publicados em relação a toxicidade da mistura desses dois agrotóxicos a biota aquática. Porém, do período de 2018 à 2023 ( por meio de uma revisão bibliográfica utilizando o banco de dados do SciVerse Scopus® com as palavras chave *Mixture and 2,4-D and Fipronil*) dos 16 estudos publicados, 14 pertencem ao próprio grupo de pesquisa (DA SILVA PINTO *et al.*, 2021; MOREIRA *et al.*, 2020b, 2020a, 2022, 2023; OGURA *et al.*, 2022; PINTO *et al.*, 2022, 2021b, 2021a, 2021c, 2023; SILBERSCHMIDT FREITAS *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2020, 2021), enquanto 2 resultaram de parcerias com nosso grupo (PORTRUNELI *et al.*, 2021; VIANA *et al.*, 2022).

Os efeitos dos contaminantes podem ocorrer em diferentes níveis de organização biológica, ou seja, desde o nível bioquímico ou fisiológico (COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993; GRIPP *et al.*, 2017; HUGGET *et al.*, 1992), indivíduo (BARATA *et al.*, 2006; KONWICK *et al.*, 2005; PAVLAKI *et al.*, 2011), a nível de população e ecossistema (GUSMÃO, 2004; NOVELLI, 2010; RESENDE, 2015; SANCHEZ, 2016), porém a maioria das informações se restringe em nível de indivíduos (CHANDLER *et al.*, 2004; SCHMITT-JANSEN *et al.*, 2008) e isto pode ser um problema, já que a extrapolação dos resultados obtidos dos teste em laboratório para os ecossistemas pode ser limitada, devido a simplificação excessiva por não se estimar aspectos importantes da ecologia da comunidade (SCHMITT-JANSEN *et al.*, 2008). Dentre estes aspectos pode-se citar: *i*) assembleias de espécies geralmente cobrem uma ampla gama de espécies com

diferentes sensibilidades, mas em testes ecotoxicológicos poucas espécies foram padronizadas em relação as que existem no ecossistema; *ii*) no ambiente as espécies estão constantemente interagindo através de competição e interação na cadeia trófica, e esta dinâmica não pode ser refletida em bioensaios usando uma única espécie; *iii*) grupos funcionais importantes dos ecossistemas acabam sendo sub-representados, já que a avaliação através de testes laboratoriais não considera a estrutura da comunidade do ecossistema em questão; e *iv*) ao restringir a avaliação ecotoxicológica ao nível da espécie, as funções do ecossistema não são consideradas (SCHMITT-JANSEN *et al.*, 2008).

### ***1.3 Ecotoxicologia e modelos ecossistêmicos***

Os modelos ecossistêmicos têm sido sugeridos como ferramentas em estudos de poluição aquática, pois possibilitam responder e entender questões entre a toxicologia experimental e a toxicologia ecológica (CHAPMAN, 2002), trazendo resultados mais relevantes ecologicamente em relação à toxicidade dos contaminantes (GUSMÃO, 2004; MOREIRA *et al.*, 2017; NOVELLI, 2010; RESENDE, 2015), inclusive impactos que os agrotóxicos podem causar ao ecossistema como um todo (MOREIRA *et al.*, 2017; NOVELLI, 2010; RESENDE, 2015; WENDT-RASCH *et al.*, 2003). Estes modelos abrem a possibilidade para que um conjunto de fatores seja avaliado simultaneamente, permitindo também que além da avaliação e quantificação dos efeitos tóxicos diretos, os efeitos indiretos também sejam analisados (MOREIRA *et al.*, 2017; NOVELLI, 2010; RESENDE, 2015; WENDT-RASCH *et al.*, 2003), como a propagação do fenômeno “cascata trófica” acompanhado de seus efeitos *top-down* e *bottom-up* (RESENDE, 2015), e a taxa e a extensão da recuperação das espécies afetadas devido ao impacto pelos contaminantes (OECD, 2004).

Não se sabe ao certo como a presença de agrotóxicos no ambiente aquático afeta a integridade do ecossistema (STEHLE; SCHULZ, 2015), e pode ser que os ecossistemas sejam incapazes de lidar com impactos devido a xenobióticos em termos de fornecimento de serviços ecossistêmicos em longo prazo (BUNDSCHUH *et al.*, 2017). Assim, a rapidez com que a comunidade retorna a um equilíbrio após uma perturbação pode ser utilizada como uma forma de se estimar a resiliência do sistema (PIMM, 1984), bem como a caracterização da estabilidade ecológica do sistema ser observada através da

capacidade de uma comunidade resistir às mudanças conseguindo manter as funções do ecossistema (resistência) e recuperar-se após um distúrbio (resiliência) (JOHNSON *et al.*, 1996; MACGILLIVRAY; GRIME; TEAM, 1995).

Um modelo considerado ecossistêmico são os mesocosmos, os quais podem ser estruturados em tanques artificiais, lagos ou encerrando parte de um ecossistema existente (OECD, 2004), sendo classificados como sistemas de tamanho médio, os quais estão entre os microcosmos de laboratório e o macrocosmos do mundo real e complexo (ODUM, 1984). Ainda, a *Organisation for Economic Co-Operation and Development* (OECD) considera os mesocosmos como sendo um sistema de escala espacial entre  $10$  à  $10^4$  m<sup>3</sup>, em que o tamanho do sistema depende do objetivo de estudo e do tipo de ecossistema que será simulado, por exemplo, estudos em mesocosmos menores (entre 1-5 m<sup>3</sup>) são mais adequados para pesquisas de três à seis meses (OECD, 2004).

Estudos utilizando modelos ecossistêmicos com o objetivo de se avaliar a contaminação de agrotóxicos vêm sendo empregados desde 1970 (BRO-RASMUSSEN; NODDEGAARD; VOLDUM-CLAUSEN, 1970), entretanto foi na década de 80 que esses modelos foram adotados na ecotoxicologia para a avaliação dos efeitos tóxicos de agrotóxicos na biota (DENOYELLES; KETTLE; SINN, 1982). No Brasil, estudos em mesocosmos/microcosmos avaliando efeitos de um conjunto de variáveis bióticas e abióticas exposto a metais (GUSMÃO, 2004) e agrotóxicos tem sido desenvolvidos (LOPES *et al.*, 2007; MOREIRA, 2017; NOVELLI, 2010; RESENDE, 2015). Dentre os estudos que analisaram a comunidade zooplanctônica foi certificada a presença do copépodo *N. iheringi* e que a subclasse Copepoda se estabelece bem em sistemas de mesocosmos (GUSMÃO, 2004; NOVELLI, 2010), podendo chegar a representar o segundo grupo mais abundante depois de Rotífera, nos sistemas não contaminados (GUSMÃO, 2004; RESENDE, 2015), demonstrando, assim, serem ótimos bioindicadores em estudos desse gênero.

Contudo, estes modelos apresentam certas limitações como: o uso de um pequeno número de réplicas (SCHMITT-JANSEN *et al.*, 2008) e a divergência entre as mesmas; são considerados caros para se construir e manter (GRANEY; GIESY; CLARK, 1995); em termos de condições hidrológicas e fluxo de nutrientes; a necessidade de um longo tempo de aclimatação para que seja possível o estabelecimento de populações de espécies e o desenvolvimento de comunidades, grupo funcionais, etc.; e a inclusão de grandes predadores de topos, como peixes carnívoros ou aves (SCHMITT-JANSEN *et al.*, 2008).

Por essas razões, a abordagem experimental unindo testes de toxicidade laboratoriais e testes em mesocosmos, pode ser uma importante ferramenta para preencher as lacunas entre esses estudos e uma tentativa de entender e prever o que pode ocorrer no ambiente natural sujeito aos impactos dos contaminantes, já que testes laboratoriais indicam o potencial do risco dos contaminantes (OECD, 2004), enquanto os estudos em mesocosmos irão determinar a relevância ecológica dos efeitos identificados em estudos laboratoriais (PARRA; JIMÉNEZ-MELERO; GUERRERO, 2005).

#### **1.4 Justificativa**

O Brasil é considerado o maior produtor de etanol de cana-de-açúcar do mundo, e a fim de melhorar ou expandir a produção da cana-de-açúcar, tem intensificado a aplicação de agrotóxicos nesses cultivos (PERES; ROZEMBERG; LUCCA, 2005; AGROFIT, 2018). Entretanto, o uso frequente e incorreto de agrotóxicos na agricultura tem sido uma das principais fontes de degradação dos ecossistemas, sendo que parte desses agrotóxicos acaba sendo levado aos ambientes aquáticos, impactando esses ecossistemas e os organismos que aí vivem (SPADOTTO, 2006). Sabe-se que a degradação do ambiente e a perda da biodiversidade prejudicam o funcionamento e a resiliência dos ecossistemas, ameaçando a capacidade dos mesmos de fornecerem continuamente o fluxo de serviços ecossistêmicos para as gerações presentes e futuras (DE GROOT *et al.*, 2012).

A degradação ambiental e os impactos negativos antropogênicos ao meio ambiente já têm sido apontados como causas de novas doenças infecciosas emergentes (SARS (2002), gripe aviária (2003), gripe suína (2009), MERS (2012), ebola (2014), zika (2015) e COVID-19 (2020)), as quais cada vez mais tem ocorrido com frequência (CHINA *et al.*, 2020). Existe também uma correlação entre a exposição do homem a longo prazo a contaminantes que estão no ambiente, incluindo agrotóxicos, com doenças crônicas e respostas imunológicas, aumentando assim o risco e vulnerabilidade a infecções virais e por microrganismos (TSATSAKIS *et al.*, 2020). Além disso, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 20 mil mortes ao ano estão relacionadas ao uso de agrotóxicos, bem como vários problemas tanto agudos como crônicos ao ser humano têm sido apontados como resultantes do emprego desses produtos (INCA, 2019).

Desta forma, este projeto de doutorado está vinculado ao projeto temático da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - “*Environmental effects of the pasture-sugarcane conversion and pasture intensification*” (Proc N° 2015/18790-3), o qual tem como objetivo principal avaliar as consequências ambientais de duas mudanças no uso e cobertura do solo que são críticas para o Brasil e para o desenvolvimento da indústria de bioenergia em outras áreas subtropicais e tropicais: a conversão de pastagens para canaviais e a intensificação das pastagens. Dentro desse objetivo tem sido desenvolvido estudos com o intuito de fornecer uma série de práticas de gestão para a preservação e integridade ambiental, maximizar os serviços ecossistêmicos, abordar como a intensificação agrícola afeta a dinâmica da água, carbono, nitrogênio e fósforo, e como a poluição (agrotóxicos) e fragmentação da agricultura afetam o funcionamento dos ecossistemas.

Portanto, avaliações ecotoxicológicas dos agrotóxicos, Regent<sup>®</sup> 800 WG (i.a. fipronil) e DMA<sup>®</sup> 806 BR (i.a.2,4-D) (isolados e em mistura), utilizados em cultivos de cana-de-açúcar, foram realizadas. Para isto, foram desenvolvidos experimentos unindo abordagens laboratoriais para se encontrar o potencial do risco dos contaminantes e estudos em mesocosmos para determinar a relevância ecológica dos efeitos identificados em estudos laboratoriais. Ainda, o conhecimento relacionado aos efeitos dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D em misturas a biota aquática são bem escassos e quase inexistentes, por isso a escolha de se fazer testes ecotoxicológico com mistura, já que estas substâncias são bastante utilizadas nos cultivos de cana-de-açúcar, e no ambiente elas ocorrem simultaneamente e não como contaminante isolado. Vale ressaltar que 2,4-D e fipronil, além de serem bastante utilizados na agricultura, são também classificados como extremamente (ADAPAR, 2020b) e altamente tóxicos (ADAPAR, 2020a) ao meio ambiente, respectivamente.

Frente à reduzida informação relacionada à toxicidade de contaminantes à subclasse Copepoda de água doce, inclusive a toxicidade de agrotóxicos, a espécie de Copepoda Calanoida *N. iheringi* foi selecionada para ser utilizada como organismo-teste. Esta espécie é conhecida por sua importância ecológica, devido a sua posição chave na cadeia trófica como consumidor secundário e também por ser indicador de ambientes eutrofizados. Assim, estudos com organismos chaves que fazem parte da base da cadeia alimentar, como os copépodos, podem demonstrar os primeiros efeitos dos agrotóxicos, antes dos mesmos atingirem os níveis tróficos superiores e levarem a um desequilíbrio

ecológico, possibilitando o planejamento de melhores manejos dessas substâncias para a proteção do ambiente e saúde humana.

## **2 OBJETIVOS E HIPÓTESES**

### **2.1 *Objetivo geral***

Avaliar os efeitos do inseticida Regent 800 WG<sup>®</sup> e do herbicida DMA 806 BR<sup>®</sup>, isolados e em mistura, ao zooplâncton por meio de testes laboratoriais e modelos ecossistêmicos, utilizando o Copepoda Calanoida *N. iheringi* como organismo-teste.

### **2.2 *Objetivos específicos***

- Analisar mudanças nas características limnológicas dos mesocosmos devido à contaminação por Regent 800 WG<sup>®</sup> e DMA 806 BR<sup>®</sup>, isolados e em mistura;
- Avaliar os efeitos de Regent 800 WG<sup>®</sup> e DMA 806 BR<sup>®</sup> isolados e em misturas, nos grandes grupos da comunidade zooplanctônica em modelos ecossistêmicos (mesocosmos), com base em modificações estruturais (densidade numérica e abundância relativa);
- Determinar os efeitos da toxicidade aguda dos agrotóxicos Regent 800 WG<sup>®</sup> e DMA 806 BR<sup>®</sup>, de forma isolada e em misturas, sobre adultos do copépodo *N. iheringi*;
- Verificar os efeitos na alimentação e na sobrevivência de adultos de *N. iheringi* após exposição ao Regent 800 WG<sup>®</sup> e DMA 806 BR<sup>®</sup>, de forma isolada e em misturas.

### **2.3 *Hipóteses***

- Regent 800 WG<sup>®</sup> e DMA 806 BR<sup>®</sup>, isolados e em misturas, irão alterar as características limnológicas do ecossistema;
- Regent 800 WG<sup>®</sup> e DMA 806 BR<sup>®</sup>, isolados e em misturas, irão causar efeitos negativos na estrutura da comunidade zooplanctônica;

- Os agrotóxicos Regent 800 WG<sup>®</sup> e DMA 806 BR<sup>®</sup>, tanto em ação isolada quanto em mistura, irão causar efeitos negativos aos organismos-testes, sendo que as misturas irão potencializar esses efeitos caracterizando um efeito de sinergia;
- O Copepoda Calanoida Neotropicais *N. iheringi*, é mais sensível ao Regent 800 WG<sup>®</sup> e DMA 806 BR<sup>®</sup>, isolados e em misturas, do que espécies de região temperada recomendadas em protocolos padronizados.
- O efeito tóxico de Regent 800 WG<sup>®</sup> e DMA 806 BR<sup>®</sup> em mistura são mais severos que o efeito dos agrotóxicos isolados.

### 3 REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373. **Ecotoxicologia aquática -Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera).** Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017.

ADAPAR - AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Bula Regent® 800 WG,** 2020a. Disponível em: <[www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos\\_restritos/files/documento/2021-01/regent800wg.pdf](http://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2021-01/regent800wg.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2022.

ADAPAR - AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Bula DMA® 806 BR,** 2020b. Disponível em: <[https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-11/dma\\_806\\_br\\_2011.pdf](https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-11/dma_806_br_2011.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2022.

AGROFIT - SISTEMA DE AGROTÓXICO E FITOSSANITÁRIO. **Dados e gráficos de registros agrotóxicos e afins.** Disponível em: <<https://indicadores.agricultura.gov.br/agrofit/index.htm>>. Acesso em: 27 fev. 2023a.

AGROFIT - SISTEMA DE AGROTÓXICO E FITOSSANITÁRIO. **Agrofit consulta aberta.** Disponível em: <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 27 fev. 2023b.

AGROFIT- SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. **Agrofit consulta aberta,** 2018. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 24 set. 2018.

ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A. J. A.; MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.



- ANSTENSRUD, M. Mating strategies of two parasitic copepods [(*Lernaocera branchialis* (L.) (Pennellidae) and *Lepeophtheirus pectoralis* (Müller) (Caligidae)] on flounder: polygamy, sex-specific age at maturity and sex ratio. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 136, n. 2, p. 141–158, 1990.
- ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B.; GONÇALVES, F. Effect of food level on the acute and chronic responses of daphnids to lindane. **Environmental Pollution**, v. 127, n. 3, p. 367–375, 2004.
- BAILEY, H. C.; MILLER, J. L.; MILLER, M. J.; WIBORG, L. C.; DEANOVIC, L.; SHED, T. Joint acute toxicity of diazinon and chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 2304–2308, 1997.
- BARATA, C.; BAIRD, D. J.; MEDINA, M.; ALBALAT, A.; SOARES, A. M. V. M. Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 230, p. 183–194, 2002.
- BARATA, C.; BAIRD, D. J.; NOGUEIRA, A. J. A.; SOARES, A. M. V. M.; RIVA, M. C. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 1, p. 1–14, 2006.
- BAYLEY, M.; BAATRUP, E. Pesticide uptake and locomotor behaviour in the woodlouse: an experimental study employing video tracking and <sup>14</sup>C-labelling. **Ecotoxicology**, Ecotoxicology. 1996.
- BEAUGRAND, G.; BRANDER, K. M.; ALISTAIR LINDLEY, J.; SOUISSI, S.; REID, P. C. Plankton effect on cod recruitment in the North Sea. **Nature**, v. 426, n. 6967, p. 661–664, 2003.
- BEGGEL, S.; WERNER, I.; CONNON, R. E.; GEIST, J. P. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval

- fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3169–3175, 2010.
- BOBÉ, A.; COSTE, C. M.; COOPER, J.-F. Factors influencing the desorption of fipronil on soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4861–4865, 1997.
- BOBÉ, A.; MEALLIER, P.; COOPER, J.-F.; COSTE, C. M. Kinetics and mechanisms of abiotic degradation of fipronil (hydrolysis and photolysis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2834–2839, 1998.
- BORTOLOZO, F. R.; AGUIAR, T. R.; HANSEL, F. A.; ROSA FILHO, E. F.; PARRON, L. V.; FROEHNER, S. Peatland as a natural sink for pesticides from no-till systems in subtropical climate. **Agricultural Water Management**, v. 163, p. 19–27, 2016.
- BOXSHALL, G. A.; DEFAYE, D. Global diversity of copepods (Crustacea: Copepoda) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 195–207, 2008.
- BRANDL, Z.; FERNANDO, C. H. Prey selection by the cyclopoid copepods *Mesocyclops edax* and *Cyclops vicinus*. **Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Verhandlungen**, v. 20, n. 4, p. 2505–2510, 1978.
- BRETELER, W. C. M. K.; FRANSZ, H. G.; GONZALEZ, S. R. Growth and development of four calanoid copepod species under experimental and natural conditions. **Netherlands Journal of Sea Research**, v. 16, p. 195–207, 1982.
- BRON, J. E.; FRISCH, D.; GOETZE, E.; JOHNSON, S. C.; LEE, C. E.; WYNGAARD, G. A. Observing copepods through a genomic lens. **Frontiers in Zoology**, v. 8, n. 1, p. 22, 2011.
- BRO-RASMUSSEN, F.; NODDEGAARD, E.; VOLDUM-CLAUSEN, K. Comparison of the disappearance of eight organophosphorus insecticides from soil in laboratory and in outdoor experiments. **Pesticide Science**, v. 1, n. 5, p. 179–182, 1970.

- BUNDSCHUH, M.; SCHULZ, R.; SCHÄFER, R. B.; ALLEN, C. R.; ANGELER, D. G. Resilience in ecotoxicology: toward a multiple equilibrium concept. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 10, p. 2574–2580, 2017.
- CALOW, P. **Handbook of Ecotoxicology**. London: Blackwell Science Ltd, 1998. 859 p.
- CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48–60, 2017.
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma técnica L5.021, Água do mar - teste de toxicidade aguda com Artemia: método de ensaio**. São Paulo: CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1991.
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma Técnica L5.018, Água – teste de toxicidade aguda com Daphnia similis Claus, (Cladocera, Crustacea): método de ensaio**. São Paulo: CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1994a.
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma Técnica L5.022, Água – avaliação de toxicidade crônica, utilizando Ceriodaphnia dubia Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea): método de ensaio**. São Paulo: CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1994b.
- CHANDER, V.; SHARMA, B.; NEGI, V.; ASWAL, R. S.; SINGH, P.; SINGH, R.; DOBHAL, R. Pharmaceutical compounds in drinking water. **Journal of Xenobiotics**, v. 6, n. 1, 2016.
- CHANDLER, G. T.; CARY, T. L.; VOLZ, D. C.; WALSE, S. S.; FERRY, J. L.; KLOSTERHAUS, S. L. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 117–124, 2004.

- CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7–15, 2002.
- CHATON, P. F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M.; MEYRAN, J. C. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding sites. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 1, p. 8–12, 2002.
- CHAVES, M. de J. S. **Validação de método analítico para determinação de 2,4-D em água natural superficial e avaliação da toxicidade deste herbicida e seu principal metabólito**. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.
- CHINA, A.; SIMONA, G. L.; ANTHAMATTENA, P.; KELSEYA, K. C.; CRAWFORDA, B. R.; WEAVERA, A. J. Pandemics and the future of human-landscape interactions. **Anthropocene**, p. 100256, 2020.
- CNAPO - COMISSÃO NACIONAL DE AGROECOLOGIA E PRODUÇÃO ORGÂNICA. **Pronara (Programa Nacional de Redução de Agrotóxicos). Desenvolvido pelo GT Agrotóxicos/CNAPO**, 2014. Disponível em: <<http://www.agroecologia.org.br/2014/09/16/pronara-programa-nacional-de-reducao-de-agrotoxicos-aprovado-por-merito-na-cnapo-em-agosto-de-2014/>>. Acesso em: 23 set. 2018.
- COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, n. 1, p. 47–54, 1993.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>. Acesso em: 27 fev. 2023.
- COORS, A.; HAMMERS-WIRTZ, M.; RATTE, H. T. Adaptation to environmental stress in *Daphnia magna* simultaneously exposed to a xenobiotic. **Chemosphere**, v. 56, n. 4, p. 395–404, 2004.

- CORREIA, N. M.; BRAZ, B. A.; FUZITA, W. E. Eficácia de herbicidas aplicados nas épocas seca e úmida para o controle de *Merremia aegyptia* na cultura da cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 631–642, 2010.
- COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803–1806, 2006.
- CUHRA, M.; TRAAVIK, T.; BØHN, T. Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 2, p. 251–262, 2013.
- DA SILVA PINTO, T. J.; MOREIRA, R. A.; DA SILVA, L. C. M.; YOSHII, M. P. C.; GOULART, B. V.; FRAGA, P. D.; DA SILVA ROLIM, V. L.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. toxicity of fipronil and 2,4-d formulations (alone and in a mixture) to the tropical amphipod *Hyaella meinerti*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 28, p. 38308–38321, 2021.
- DAAM, M. A.; VAN DEN BRINK, P. J. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 24–37, 2010.
- DE GROOT, R.; BRANDER, L.; VAN DER PLOEG, S.; COSTANZA, R.; BERNARD, F.; BRAAT, L.; CHRISTIE, M.; CROSSMAN, N.; GHERMANDI, A.; HEIN, L.; HUSSAIN, S.; KUMAR, P.; MCVITTIE, A.; PORTELA, R.; RODRIGUEZ, L. C.; TEN BRINK, P.; VAN BEUKERING, P. Global estimates of the value of ecosystems and their services in monetary units. **Ecosystem Services**, v. 1, n. 1, p. 50–61, 2012.
- DE HOOP, L.; BROCH, O. J.; HENDRIKS, A. J.; DE LAENDER, F. crude oil affecting the biomass of the marine copepod *Calanus finmarchicus*: comparing a simple and complex population model. **Marine Environmental Research**, v. 119, p. 197–206, 2016.

- DENOYELLES, F.; KETTLE, W. D.; SINN, D. E. The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. **Ecology**, v. 63, n. 5, p. 1285–1293, 1982.
- DEVREKER, D.; SOUISSI, S.; SEURONT, L. Development and mortality of the first naupliar stages of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) under different conditions of salinity and temperature. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 303, n. 1, p. 31–46, 2004.
- DIAS, M. O. de S.; MACIEL FILHO, R.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.
- ESPÍNDOLA, E. L. G. **Dinâmica da associação congênica das espécies de Notodiaptomus (Copepoda, Calanoida) no reservatório de Barra bonita, São Paulo**. Universidade de São Paulo, São Carlos, 1994.
- ESTEVES, K. E.; SENDACZ, S. Relações entre a biomassa do zooplâncton e o estado trófico de reservatórios do estado de São Paulo. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 11, p. 587–604, 1988.
- FAVARI, L.; LÓPEZ, E.; MARTÍNEZ-TABCHE, L.; DÍAZ-PARDO, E. Effect of insecticides on plankton and fish of Ignacio Ramirez Reservoir (Mexico): a biochemical and biomagnification study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, n. 3, p. 177–186, 2002.
- FERREIRA, A. L. G.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 28–39, 2008.
- FORGET, J.; PAVILLON, J.-F.; BELIAEFF, B.; BOCQUENÉ, G. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC<sub>50</sub> values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 912–918, 1999.

- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle De Efluentes Líquidos**. São Paulo: CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1990. 17 p.
- GORBI, G.; INVIDIA, M.; SAVORELLI, F.; FARAPONOVA, O.; GIACCO, E.; CIGAR, M.; BUTTINO, I.; LEONI, T.; PRATO, E.; LACCHETTI, I.; SEI, S. Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 9, p. 2023–2028, 2012.
- GOWING, M. M.; WISHNER, K. F. Trophic relationships of deep-sea calanoid copepods from the benthic boundary layer of the Santa Catalina Basin, California. **Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers**, v. 33, n. 7, p. 939–961, 1986.
- GRANEY, R. L.; GIESY, J. P.; CLARK, J. R. Field studies. *Em*: RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. Washington, Estados Unidos: Taylor & Francis, 1995. p. 257–305.
- GRIPP, H. S.; FREITAS, J. S.; ALMEIDA, E. A.; BISINOTI, M. C.; MOREIRA, A. B. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 173–179, 2017.
- GUSMÃO, L. F. M. de. **Efeitos do cobre e cromo na comunidade zooplanctônica: um estudo experimental em mesocosmos**. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- HAN, J.; WON, E.-J.; KANG, H.-M.; LEE, M.-C.; JEONG, C.-B.; KIM, H.-S.; HWANG, D.-S.; LEE, J.-S. Marine copepod cytochrome p450 genes and their applications for molecular ecotoxicological studies in response to oil pollution. **Marine Pollution Bulletin**, Special Issue: Hong Kong Conference 2016. v. 124, n. 2, p. 953–961, 2017.

- HANAZATO, T. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. **Environmental Pollution**, v. 112, n. 1, p. 1–10, 2001.
- HERBRANDSON, C.; BRADBURY, S. P.; SWACKHAMER, D. L. Influence of suspended solids on acute toxicity of carbofuran to *Daphnia magna*: I. Interactive effects. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 333–342, 2003.
- HEUSCHELE, J.; LODE, T.; KONESTABO, H. S.; TITELMAN, J.; ANDERSEN, T.; BORGÅ, K. Drivers of copper sensitivity in copepods: a meta-analysis of LC50s. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, p. 113907, 2022.
- HINTZEN, E. P.; LYDY, M. J.; BELDEN, J. B. Occurrence and potential toxicity of pyrethroids and other insecticides in bed sediments of urban streams in central Texas. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 1, p. 110–116, 2009.
- HONG, L. C. D.; SLOOTEN, K. B.-V.; TARRADELLAS, J. Tropical ecotoxicity testing with *Ceriodaphnia cornuta*. **Environmental Toxicology**, v. 19, n. 5, p. 497–504, 2004.
- HOOFF, R. C.; PETERSON, W. T. Copepod biodiversity as an indicator of changes in ocean and climate conditions of the northern California current ecosystem. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 6, p. 2607–2620, 2006.
- HOOK, S. E.; FISHER, N. S. Relating the reproductive toxicity of five ingested metals in calanoid copepods with sulfur affinity. **Marine Environmental Research**, v. 53, n. 2, p. 161–174, 2002.
- HOSE, G. C.; SYMINGTON, K.; LOTT, M. J.; LATEGAN, M. J. The Toxicity of arsenic(iii), chromium(vi) and zinc to groundwater copepods. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 18704–18713, 2016.
- HOUSSOU, A. M.; DANGUÉGUÉ, E. J.; MONTCHOWUI, E. Lethal and sub-lethal effects of cypermethring and glyphosate on the freshwater's copepod, *Acanthocyclops robustus*. **Invertebrate Survival Journal**, v. 14, p. 140–148, 2017.



HUGGET, R. J.; KLMERLE, R. A.; JR. MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Taylor & Francis, 1992. 337 p.

HUMES, A. G. Siphonostomatoid copepods (asterocheridae) associated with the sponge *Dysidea* in the moluccas. **Systematic Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 157–177, 1996.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Painéis de Informações de Agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>>. Acesso em: 27 fev. 2023a.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatório de Comercialização de Agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>. Acesso em: 27 fev. 2023b.

IEA - INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Relação de Troca Produtos/Insumos**. Disponível em: <<https://www.ciagri.iea.sp.gov.br/bancodedados/valorproducao>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Agrotóxico**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>>. Acesso em: 26 fev. 2020.

ISO 14669 - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water quality - Determination of Acute Lethal Toxicity to Marine Copepods (Copepoda, Crustacea)**. Geneva: International Organization for Standardization, 1999. 16 p.

- JACOBI, P. R.; GIATTI, L.; TOLEDO, R. F. de; JACOBI, P. R.; GIATTI, L.; TOLEDO, R. F. de. A reflection opposing the massification of agricultural production. **Ambiente & Sociedade**, v. 19, n. 3, p. 1–6, 2016.
- JOHNSON, K. H.; VOGT, K. A.; CLARK, H. J.; SCHMITZ, O. J.; VOGT, D. J. Biodiversity and the productivity and stability of ecosystems. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 9, p. 372–377, 1996.
- JONES, D. K.; HUA, J.; RELYEA, R. A. Effects of endosulfan in freshwater pond communities. **Freshwater Science**, v. 35, n. 1, p. 152–163, 2016.
- JONKER, M. J.; SVENDSEN, C.; BEDAUX, J. J. M.; BONGERS, M.; KAMMENGA, J. E. 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.
- KONWICK, B. J.; FISK, A. T.; GARRISON, A. W.; AVANTS, J. K.; BLACK, M. C. Acute enantioselective toxicity of fipronil and its desulfinyl photoproduct to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 2350–2355, 2005.
- KULKARNI, D.; GERGS, A.; HOMMEN, U.; RATTE, H. T.; PREUSS, T. G. A plea for the use of copepods in freshwater ecotoxicology. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 1, p. 75–85, 2013.
- KUSK, K. O.; WOLLENBERGER, L. **Validation of full Life-Cycle Test with the Copepod *Acartia tonsa***, 2005. Disponível em: <<http://orbit.dtu.dk/files/6580934/MR2005-146.pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2018.
- LEGRAND, E.; BOULANGÉ-LECOMTE, C.; RESTOUX, G.; TRÉMOLET, G.; DUFLOT, A.; FORGET-LERAY, J. Individual and mixture acute toxicity of model pesticides chlordecone and pyriproxyfen in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 6, p. 5976–5984, 2017.
- LEITE, R. C. de C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos estudos CEBRAP**, n. 78, p. 15–21, 2007.

- LIU, S.-S.; WANG, C.-L.; ZHANG, J.; ZHU, X.-W.; LI, W.-Y. Combined toxicity of pesticide mixtures on green algae and photobacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 95, p. 98–103, 2013.
- LOPES, I.; MOREIRA-SANTOS, M.; DA SILVA, E. M.; SOUSA, J. P.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. In situ assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. **Chemosphere**, v. 67, n. 11, p. 2250–2256, 2007.
- LOPES, L. F. de P.; AGOSTINI, V. O.; MUXAGATA, E. Could some procedures commonly used in bioassays with the copepod *Acartia tonsa* Dana 1849 distort results? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, p. 353–365, 2018.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. de L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B. de; AMORIM, H. V. de. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.
- LUGO, A.; BRAVO-INCLÁN, L. A.; ALCOCER, J.; GAYTÁN, M. L.; OLIVA, M. G.; SÁNCHEZ, M. del R.; CHÁVEZ, M.; VILACLARA, G. Effect on the planktonic community of the chemical program used to control water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Guadalupe Dam, Mexico. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 1, n. 3–4, p. 333–343, 1998.
- MACGILLIVRAY, C. W.; GRIME, J. P.; TEAM, T. I. S. P. (ISP). Testing predictions of the resistance and resilience of vegetation subjected to extreme events. **Functional Ecology**, v. 9, n. 4, p. 640–649, 1995.
- MAGNUSSON, M.; HEIMANN, K.; QUAYLE, P.; NEGRI, A. P. Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 11, p. 1978–1987, 2010.
- MAJUMDER, R.; KAVIRAJ, A. Variation in acute toxicity between technical grade and commercial formulation of cypermethrin to some non-target freshwater organisms. **International Journal of Current Research**, v. 7, n. 6, p. 16755–16759, 2015.

- MANSANO, A. da S.; OLIVEIRA, L. L. D. de; ROCHA, O. Avaliação da toxicidade aguda do antibiótico ciprofloxacina aos cladóceros *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia silvestrii*. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 8, n. 12, p. 76–88, 2012.
- MANSANO, A. S.; MOREIRA, R. A.; PIEROZZI, M.; OLIVEIRA, T. M. A.; VIEIRA, E. M.; ROCHA, O.; REGALI-SELEGHIM, M. H. Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: the use of protozoan in ecotoxicology. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 160–172, 2016.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário Estatístico da Agroenergia**. Brasília/DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 160 p.
- MARTIN, J. H. the possible transport of trace metals via moulted copepod exoskeletons. **Limnology and Oceanography**, v. 15, n. 5, p. 756–761, 1970.
- MARTINS, J.; OLIVA TELES, L.; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. **Environment International**, v. 33, n. 3, p. 414–425, 2007.
- MATSUMURA-TUNDISI, T.; GALIZIA TUNDISI, J. Calanoida (Copepoda) species composition changes in the reservoirs of São Paulo State (Brazil) in the last twenty years. **Hydrobiologia**, v. 504, n. 1, p. 215–222, 2003.
- MATSUMURA-TUNDISI, T.; RIETZLER, A. C.; TUNDISI, J. G. Biomass (dry weight and carbon content) of plankton crustacea from Broa Reservoir (São Carlos, S.P.-Brazil) and its fluctuation across one year. **Hydrobiologia**, v. 179, n. 3, p. 229–236, 1989.
- MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. Plankton richness in a eutrophic reservoir (Barra Bonita Reservoir, SP, Brazil). **Hydrobiologia**, v. 542, n. 1, p. 367–378, 2005.

- MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G.; ROCHA, O. Zooplankton diversity in eutrophic systems and its relation to the occurrence of cyanophycean blooms. **SIL Proceedings, 1922-2010**, v. 28, n. 2, p. 671–674, 2002.
- MEDINA, M.; BARATA, C.; TELFER, T.; BAIRD, D. J. Age- and sex-related variation in sensitivity to the pyrethroid cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa* Dana. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 17–22, 2002.
- MEFFE, R.; DE BUSTAMANTE, I. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: a first overview of the situation in Italy. **Science of The Total Environment**, v. 481, p. 280–295, 2014.
- MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 2015.
- MOREIRA, R. A. **Efeitos dos agrotóxicos Kraft 36 EC (abamectina) e Score 250 EC (difenoconazol), isolados e em misturas, sobre organismos zooplanctônicos**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.
- MOREIRA, R. A.; CORDERO-DE-CASTRO, A.; POLO-CASTELLANO, C.; PINTO, T. J. S.; DIAS, M. A.; MONTAGNER, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; ARAÚJO, C. V. M.; BLASCO, J. Avoidance responses by *Danio rerio* reveal interactive effects of warming, pesticides and their mixtures. **Science of The Total Environment**, v. 847, p. 157525, 2022.
- MOREIRA, R. A.; DAAM, M. A.; VIEIRA, B. H.; SANCHES, A. L. M.; REGHINI, M. V.; DA SILVA MANSANO, A.; DE FREITAS, E. C.; ESPINDOLA, E. L. G.; ROCHA, O. 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, 2017.
- MOREIRA, R. A.; POLO-CASTELLANO, C.; CORDERO-DE-CASTRO, A.; DIAS, M. A.; PINTO, T. J. S.; MONTAGNER, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; BLASCO, J.; ARAÚJO, C. V. M. Short and long-term exposure to the pesticides

- fipronil and 2,4-D: effects on behavior and life history of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 310, p. 136719, 2023.
- MOREIRA, R. A.; ROCHA, G. S.; DA SILVA, L. C. M.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; MELÃO, M. da G. G.; ESPINDOLA, E. L. G. 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, 2020a.
- MOREIRA, R. A.; ROCHA, O.; PINTO, T. J. da S.; DA SILVA, L. C. M.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; ESPINDOLA, E. L. G. Life-history traits response to effects of fish predation (Kairomones), fipronil and 2,4-D on neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, n. 3, p. 298–309, 2020b.
- NEWBOLD, C. Herbicides in aquatic systems. **Biological Conservation**, v. 7, n. 2, p. 97–118, 1975.
- NOVELLI, A. **Efeito do Vertimec® 18CE e de seu princípio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e in situ**. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- ODUM, E. P. The mesocosm. **BioScience**, v. 34, n. 9, p. 558–562, 1984.
- OECD- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Draft Guidance Document on Simulated Freshwater Lentic Field Tests (Outdoor Microcosms and Mesocosms)**. Organization for Economic Cooperation and Development, 2004. Disponível em: <<https://www.oecd.org/fr/securitechimique/essais/32612239.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2023.
- OGURA, A. P.; MOREIRA, R. A.; DA SILVA, L. C. M.; NEGRO, G. S.; FREITAS, J. S.; DA SILVA PINTO, T. J.; LOPES, L. F. de P.; YOSHII, M. P. C.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Irrigation with water contaminated by sugarcane pesticides and vinasse can inhibit seed

- germination and crops initial growth. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 3, p. 330–340, 2022.
- OHTSUKA, S.; ONBÉ, T. Relationship between mouthpart structures and in situ feeding habits of species of the family Pontellidae (Copepoda: Calanoida). **Marine Biology**, v. 111, n. 2, p. 213–225, 1991.
- OKUMURA, D. T. **Estudos ecotoxicológicos com as espécies *Argyrodiaptomus furcatus* e *Notodiaptomus iheringi* (Copepoda, Calanoida)**. Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-15032011-140613/>>. Acesso em: 13 jul. 2022.
- PANE, L.; AGRONE, C.; GIACCO, E.; SOMÀ, A.; MARIOTTINI, G. L. Utilization of marine crustaceans as study models: a new approach in marine ecotoxicology for European (REACH) Regulation. *Em*: BEGUM, G. **Ecotoxicology**. Genova: InTech, 2012. p. 91–106.
- PARRA, G.; JIMÉNEZ-MELERO, R.; GUERRERO, F. Agricultural impacts on mediterranean wetlands: the effect of pesticides on survival and hatching rates in copepods. **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**, v. 41, n. 3, p. 161–167, 2005.
- PATZEK, T. W. Can the earth deliver the biomass-for-fuel we demand? *Em*: PIMENTEL, D. **Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems: Benefits and Risks**. Ithaca: Springer Netherlands, 2008. p. 19–56.
- PAVLAKI, M. D.; PEREIRA, R.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 99–110, 2011.
- PEDERSON, G. L.; WELCH, E. B.; LITT, A. H. Plankton secondary productivity and biomass: their relation to lake trophic state. **Hydrobiologia**, v. 50, n. 2, p. 129–144, 1976.
- PEREIRA, J. L.; ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B.; MARQUES, C. R.; GONÇALVES, A. M. M.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Toxicity evaluation

of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 4, p. 455–463, 2009.

PERES, F.; ROZEMBERG, B.; LUCCA, S. R. de. Percepção de riscos no trabalho rural em uma região agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: agrotóxicos, saúde e ambiente. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1836–1844, 2005.

PERET, A. M.; OLIVEIRA, L. F.; BIANCHINI, I.; SELEGHIM, M. H. R.; PERET, A. C.; MOZETO, A. A. Dynamics of fipronil in Óleo Lagoon in Jataí Ecological Station, São Paulo-Brazil. **Chemosphere**, v. 78, n. 10, p. 1225–1229, 2010.

PESTANA, J. L. T.; LOUREIRO, S.; BAIRD, D. J.; SOARES, A. M. V. M. Fear and loathing in the benthos: responses of aquatic insect larvae to the pesticide imidacloprid in the presence of chemical signals of predation risk. **Aquatic Toxicology**, v. 93, n. 2, p. 138–149, 2009.

PHYU, Y. L.; PALMER, C. G.; WARNE, M. St. J.; HOSE, G. C.; CHAPMAN, J. C.; LIM, R. P. A comparison of mixture toxicity assessment: examining the chronic toxicity of atrazine, permethrin and chlorothalonil in mixtures to *Ceriodaphnia cf. dubia*. **Chemosphere**, v. 85, n. 10, p. 1568–1573, 2011.

PIMM, S. L. The complexity and stability of ecosystems. **Nature**, v. 307, n. 5949, p. 321–326, 1984.

PINHEIRO, A.; SILVA, M. R. D.; KRAISCH, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v. 7, n. 2, p. 17–26, 2010.

PINTO, T. J. D. S.; ROCHA, G. S.; MOREIRA, R. A.; DA SILVA, L. C. M.; YOSHII, M. P. C.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. Chronic environmentally relevant levels of pesticides disrupt energy reserves, feeding rates, and life-cycle responses in the amphipod *Hyaella meinerti*. **Aquatic Toxicology**, v. 245, 2022.

PINTO, T. J. da S.; FREITAS, J. S.; MOREIRA, R. A.; SILVA, L. C. M. da; YOSHII, M. P. C.; LOPES, L. F. de P.; GOULART, B. V.; VANDERLEI, M. R.;



- ATHAYDE, D. B.; FRAGA, P. D.; OGURA, A. P.; SCHIESARI, L.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. 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, 2021a.
- PINTO, T. J. da S.; MOREIRA, R. A.; FREITAS, J. S. ; DA SILVA, L. C. M.; YOSHII, M. P. C.; DE PALMA LOPES, L. F.; OGURA, A. P.; DE MELLO GABRIEL, G. V.; ROSA, L. M. T.; SCHIESARI, L.; DO CARMO, J. B.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. Responses of *Chironomus sancticaroli* to the simulation of environmental contamination by sugarcane management practices: water and sediment toxicity. **Science of The Total Environment**, v. 857, p. 159643, 2023.
- PINTO, T. J. da S.; MOREIRA, R. A.; SILVA, L. C. M. da; YOSHII, M. P. C.; GOULART, B. V.; FRAGA, P. D.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. Impact of 2,4-D and fipronil on the tropical midge *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, p. 111778, 2021b.
- PINTO, T. J. da S.; ROCHA, G. S.; MOREIRA, R. A.; SILVA, L. C. M. da; YOSHII, M. P. C.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. Multi-generational exposure to fipronil, 2,4-D, and their mixtures in *Chironomus sancticaroli*: biochemical, individual, and population endpoints. **Environmental Pollution**, v. 283, p. 117384, 2021c.
- POR, F. D.; HADEL, V. F. Two new species of *Attheyella* (Copepoda: Harpacticoida: Canthocamptidae) from bromeliads of the Serra Da Jureia (São Paulo, Brazil). **Journal of Crustacean Biology**, v. 6, n. 4, p. 777–788, 1986.
- PORTRUNELI, N.; BONANSEA, R. I.; VALDÉS, M. E.; DA SILVA, L. C. M.; VIANA, N. P.; GOULART, B. V.; SOUZA, I. da C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; MONTAGNER, C. C.; WUNDERLIN, D. A.; FERNANDES, M. N. Whole-Body bioconcentration and biochemical and morphological responses of gills of the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic

- acid or fipronil individually or in a mixture. **Aquatic Toxicology**, v. 240, p. 105987, 2021.
- RAISUDDIN, S.; KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; SCHLENK, D.; LEE, J.-S. The copepod *Tigriopus*: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. **Aquatic Toxicology**, v. 83, n. 3, p. 161–173, 2007.
- RESENDE, J. C. **Efeitos diretos e indiretos do agrotóxico Vertimec® 18 CE e de girinos de *Lithobates catesbeianus* nos ecossistemas de água doce: um estudo em mesocosmos**. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- RICO-MARTÍNEZ, R.; ARIAS-ALMEIDA, J. C.; PÉREZ-LEGASPI, I. A.; ALVARADO-FLORES, J.; RETES-PRUNEDA, J. L. Adverse effects of herbicides on freshwater zooplankton. *Em*: EL-GHANY HASANEEN, M. N. A. **Herbicides-Properties, Synthesis and Control of Weeds**. Medellín/ Veracruz: InTech, 2012. p. 405–434.
- RIETZLER, A. C.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. Life cycle, feeding and adaptive strategy implications on the co-occurrence of *Argyrodiaptomus furcatus* and *Notodiatptomus iheringi* in Lobo-Broa Reservoir (SP, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 93–105, 2002.
- ROCHA, O.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Biomass and production of *Argyrodiaptomus furcatus*, a tropical calanoid copepod in Broa Reservoir, Southern Brazil. **Hydrobiologia**, v. 113, n. 1, p. 307–311, 1984.
- ROCHA, O.; NETO, A. J. G.; DOS SANTOS LIMA, J. C.; FREITAS, E. C.; MIGUEL, M.; DA SILVA MANSANO, A.; MOREIRA, R. A.; DAAM, M. A. Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 7, p. 834–844, 1 set. 2018.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996. 1028 p.

- SAHA, S.; KAVIRAJ, A. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, n. 1, p. 49–52, 2008.
- SANCHEZ, A. L. **Avaliação de risco ecológico em cenários de contaminação por pesticidas: respostas de indivíduos a ecossistemas**. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- SANTAROSSA, M. A. da S. **Contaminação de águas de pesque-pague por agrotóxicos e cafeína em áreas de cultivo de cana-de-açúcar**. Universidade Estadual Paulista, Jabotical, SP, 2017.
- SCHMITT-JANSEN, M.; VEIT, U.; DUDEL, G.; ALTENBURGER, R. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: approaches and challenges. **Basic and Applied Ecology**, v. 9, n. 4, p. 337–345, 2008.
- SHARMA, K. K.; SHARMA, A.; JAMWAL, H.; SHARMA, N.; KOUR, A. Toxic effects (by LC50 analysis) of cypermethrin on a Cyclopoid copepod, *Mesocyclops leuckarti* (Claus, 1857). **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 5, n. 1, p. 215–217, 2014.
- SHRAIM, A.; DIAB, A.; ALSUHAIMI, A.; NIAZY, E.; METWALLY, M.; AMAD, M.; SIOUD, S.; DAWOUD, A. Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S719–S729, 2017.
- SILBERSCHMIDT FREITAS, J.; DA SILVA PINTO, T. J.; CARDOSO YOSHII, M. P.; CONCEIÇÃO MENEZES DA SILVA, L.; DE PALMA LOPES, L. F.; PRETTI OGURA, A.; GIROTTO, L.; MONTAGNER, C. C.; DE OLIVEIRA GONÇALVES ALHO, L.; CASTELHANO GEBARA, R.; SCHIESARI, L.; GAETA ESPÍNDOLA, E. L. Realistic exposure to fipronil, 2,4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. **Environmental Pollution**, v. 299, p. 118894, 2022.
- SILVA, A. R. R.; CARDOSO, D. N.; CRUZ, A.; LOURENÇO, J.; MENDO, S.; SOARES, A. M. V. M.; LOUREIRO, S. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary

- combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, p. 279–290, 2015.
- SILVA, L. C. M.; MOREIRA, R. A.; PINTO, T. J. S.; OGURA, A. P.; YOSHII, M. P. C.; LOPES, L. F. P.; MONTAGNER, C. C.; GOULART, B. V.; DAAM, M. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology**, 2020.
- SILVA, L. C. M.; MOREIRA, R. A.; PINTO, T. J. S.; VANDERLEI, M. R.; ATHAYDE, D. B.; LOPES, L. F. P.; OGURA, A. P.; YOSHII, M. P. C.; FREITAS, J. S.; MONTAGNER, C. C.; GOULART, B. V.; SCHIESARI, L.; DAAM, M. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Lethal and sublethal toxicity of pesticides and vinasse used in sugarcane cultivation to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). **Aquatic Toxicology**, v. 241, p. 106017, 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.
- SOUISSI, S.; CARLOTTI, F.; NIVAL, P. Food- and temperature-dependent function of moulting rate in copepods: an example of parameterization for population dynamics models. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 9, p. 1331–1346, 1997.
- SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, v. 1, p. 1–9, 2006.
- STEHLE, S.; SCHULZ, R. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5750–5755, 2015.
- STØTTRUP, J. G.; RICHARDSON, K.; KIRKEGAARD, E.; PIHL, N. J. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 52, n. 2, p. 87–96, 1986.

TAKAHASHI, H.; CHANG, K.-H.; HANAZATO, T. Acute toxicity of the insecticide diazinon and carbaryl to calanoid and cyclopoid copepoda (*Eodiaptomus*, *Mesocyclops* and *Thermocyclops*) in different life stages. **Japanese Journal of Environmental Toxicology**, v. 9, n. 2, p. 133–139, 2006.

TEH, S.; LESMEITER, S.; HAMMOCK, B. G. **The acute and chronic effects of pesticides on the Calanoid copepods, Eurytemora affinis and Pseudodiaptomus forbesi, of the San Francisco Estuary**, 2013. Disponível em:

<<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.431.6815&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

TSATSAKIS, A.; PETRAKIS, D.; NIKOLOUZAKIS, T. K.; DOCEA, A. O.; CALINA, D.; VINCETI, M.; GOUMENOU, M.; KOSTOFF, R. N.; MAMOULAKIS, C.; ASCHNER, M.; HERNÁNDEZ, A. F. COVID-19, an opportunity to reevaluate the correlation between long-term effects of anthropogenic pollutants on viral epidemic/pandemic events and prevalence. **Food and Chemical Toxicology**, v. 141, p. 111418, 2020.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Limnology**. Boca Ratón: CRC Press, 2017. 888 p.

TURNER, J. T. Zooplankton feeding ecology: contents of fecal pellets of the copepod *Centropages velificatus* from waters near the mouth of the Mississippi river. **The Biological Bulletin**, v. 173, n. 2, p. 377–386, 1987.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Observatório da Cana e Bioenergia**. Disponível em: <<https://observatoriodacana.com.br/listagem.php?idMn=4>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **New Pesticide Fact Sheet. EPA 737-F-96-005**. Washington: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances: U.S. Environmental Protection Agency, 1996. 10 p.

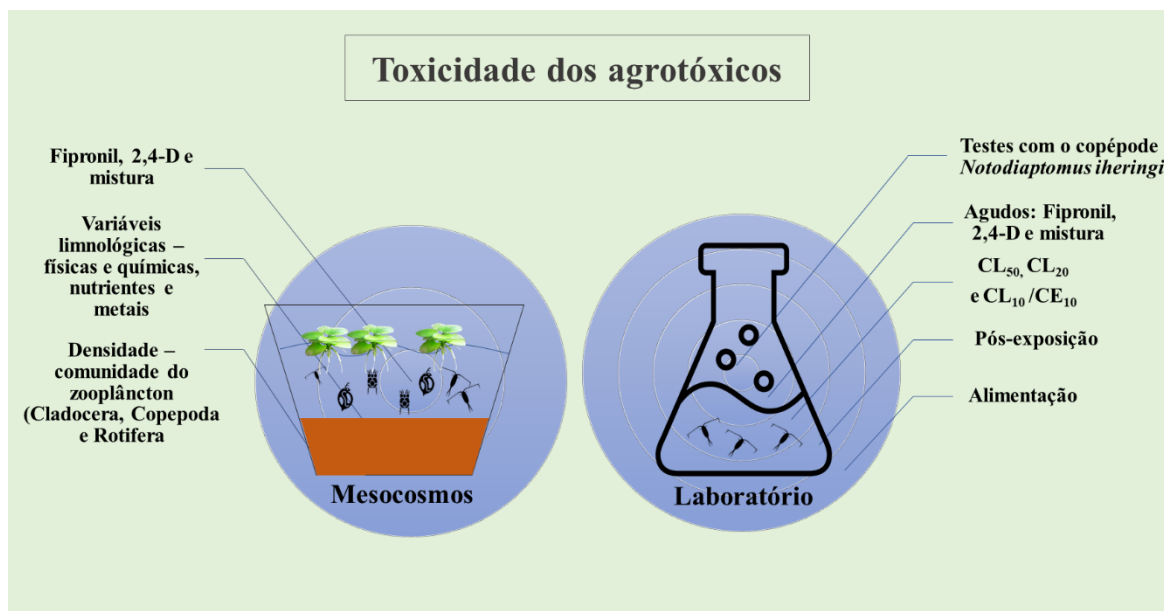
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Inert Ingredient Regulation**, 2018a. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticide-registration/inert-ingredients-regulation>>. Acesso em: 10 dez. 2018.
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **US-EPA Database**, 2018b. Disponível em: <<https://cfpub.epa.gov/ecotox/>>. Acesso em: 6 dez. 2018.
- VAN WIJNGAARDEN, R. P. A.; BROCK, T. C. M.; VAN DEN BRINK, P. J.; GYLSTRA, R.; MAUND, S. J. Ecological effects of spring and late summer applications of lambda-cyhalothrin on freshwater microcosms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 220–239, 2006.
- VESTHEIM, H.; KAARTVEDT, S.; EDVARDSEN, B. State-dependent vertical distribution of the carnivore copepod *Pareuchaeta norvegica*. **Journal of Plankton Research**, v. 27, n. 1, p. 19–26, 2005.
- VIANA, N. P.; DA SILVA, L. C. M.; PORTRUNELI, N.; SOARES, M. P.; CARDOSO, I. L.; BONANSEA, R. I.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; WUNDERLIN, D. A.; FERNANDES, M. N. Bioconcentration and toxicological impacts of fipronil and 2,4-D commercial formulations (single and in mixture) in the tropical fish, *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 8, p. 11685–11698, 2022.
- WARREN, N.; ALLAN, I. J.; CARTER, J. E.; HOUSE, W. A.; PARKER, A. Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments—a review. **Applied Geochemistry**, v. 18, n. 2, p. 159–194, 2003.
- WENDT-RASCH, L.; FRIBERG-JENSEN, U.; WOIN, P.; CHRISTOFFERSEN, K. Effects of the pyrethroid insecticide cypermethrin on a freshwater community studied under field conditions. II. Direct and indirect effects on the species composition. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 373–389, 2003.

- WILLIAMSON, C. E.; REID, J. W. Copepoda. *Em*: THORP, J. H.; COVICH, A. P. **Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates**. 2. ed. New York: Academic Press, 2001. p. 915–954.
- WILLIS, K. J.; LING, N. Toxicity of the aquaculture pesticide cypermethrin to planktonic marine copepods. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 3, p. 263–270, 2004.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP: Rima, 2008. 472 p.
- ZHANG, Q.; UHLIG, G. Effect of density on larval development and female productivity of *Tisbe holothuriae* (Copepoda, Harpacticoida) under laboratory conditions. **Helgoländer Meeresuntersuchungen**, v. 47, n. 2, p. 229–241, 1993.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**



Este estudo foi desenvolvido por meio de experimentos realizados em modelos ecossistêmicos (mesocosmos) e em laboratório (testes de toxicidade aguda e de pós-exposição). Na Figura 2 estão esquematizadas todas as etapas envolvidas nesta pesquisa, as quais serão descritas em capítulos.



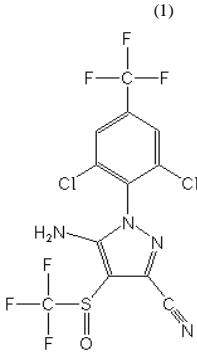
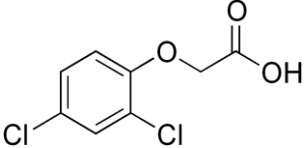
**Figura 2.** Delineamento experimental do presente estudo. CL<sub>50</sub> – Concentração letal a 50% dos organismos testados; CL<sub>20</sub> – Concentração letal a 20% dos organismos testados; CL<sub>10</sub> – Concentração letal a 10% dos organismos testados; e CE<sub>10</sub> – Concentração que causa efeito a 10% dos organismos testados.

#### 4.1 Agrotóxicos utilizados no estudo

Conforme mencionado anteriormente foram utilizadas as formulações comerciais do inseticida Regent 800<sup>®</sup> WG (BASF S.A.), i.a. fipronil (80% w/ w) e o herbicida DMA 806<sup>®</sup> BR (Dow AgroSciences Industrial Ltda), i.a. 2,4-D (67% w/v do ácido equivalente). O fipronil pode ser formulado como um sólido, um *spray* líquido ou como um produto granulado (US EPA, 1996) e o herbicida 2,4-D pode ser formulado como um produto líquido, um pó ou granulado (US EPA, 2014). A fórmula básica de 2,4-D é o ácido, mas geralmente é formulado como um sal inorgânico, amina, ou éster através de vários processos de fabricação (KENNEPOHL; MUNRO; BUS, 2010). Entretanto, todas as formas desses agrotóxicos podem influenciar de alguma maneira a distribuição e efeitos desses agrotóxicos no ambiente (BOBÉ *et al.*, 1998; GUNASEKARA *et al.*, 2007; MARTINS; OLIVA TELES; VASCONCELOS, 2007; US EPA, 1996, 2014). Na Tabela

1 são apresentadas algumas informações relacionadas à fórmula estrutural e as propriedades físico-químicas de fipronil e 2,4-D.

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas do inseticida fipronil e o herbicida 2,4-D.

Propriedades físico-químicas	Fipronil	2,4-D
Fórmula estrutural	(1) 	(6) 
Número registrado <i>Chemical Abstract Service</i> (CAS #)	120068-37-3 (2)	94-75-7 (2)
Grupo químico	Fenil pirazol (3)	Ácido ariloxialcanoico (6)
Formula molecular	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> C <sub>12</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> OS (4)	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (7)
Forma física	Sólido branco (2)	Pó incolor (2)
Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	473,2 (2)	221,0 (2)
Solubilidade na água (mg L <sup>-1</sup> )	2,4 (pH 5,0) (3) 2,2 (pH 9,0) (3)	20031 (pH 5,0; 25,0 °C) (7) 34196 (pH 9,0; 25,0 °C) (7)
Ponto de fusão	195,5 – 203,0 °C (3)	140,5 °C (2)
Pressão de vapor (Pa, 20,0 °C)	3,7 x 10 <sup>-7</sup> (2)	1,1 x 10 <sup>-2</sup> (2)
Densidade (g mL <sup>-1</sup> )	1,6262 (20,0 °C) (3)	1,565 (30,0 °C) (2)

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas do inseticida fipronil e o herbicida 2,4-D (Continuação).

Propriedades físico-químicas	Fipronil	2,4-D
<b>Coefficiente de partição Octanol – água (<math>\log K_{ow}</math>)</b>	4,01 (pH 5,9 – 6,1; 23,0 °C) <sup>(3)</sup>	0,18 (pH 5,0; 25,0 °C) <sup>(7)</sup>
<b>Hidrólise (meia-vida)</b>	Mais que 100,0 dias (pH 5,5 e 7,0) <sup>(5)</sup> 32,08 dias (pH 9,0) <sup>(5)</sup> 4,75 dias (pH 10,0) <sup>(5)</sup> 11,0 horas (pH 11,0) <sup>(5)</sup> 2,4 horas (pH 12,0) <sup>(5)</sup>	Estável (pH 5,0; 7,0 e 9,0; 25,0 °C) <sup>(7)</sup>
<b>Fotodegradação (meia-vida; água)</b>	Meia-vida de 3,63 horas (luz de laboratório) <sup>(3)</sup>	13,0 dias <sup>(7)</sup>
<b>Fotodegradação (meia-vida; solo)</b>	Meia-vida de 34,0 dias (solo argiloso) <sup>(3)</sup>	Estável <sup>(7)</sup>
<b>Metabolismo* aeróbico (meia-vida; solo)</b>	122,0-128,0 dias (solo arenoso e argiloso) <sup>(3)</sup>	-
<b>Metabolismo* anaeróbico (meia-vida; água)</b>	116,0-130,0 dias (água e sedimento) <sup>(3)</sup>	-

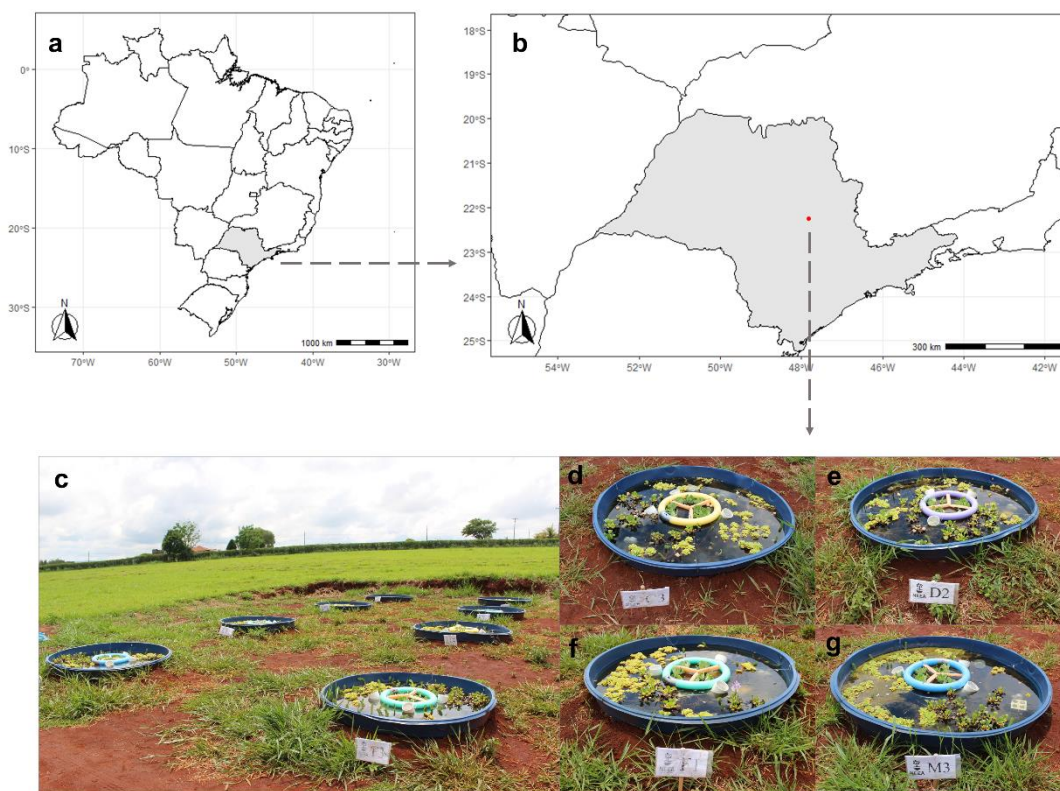
\***Metabolismo** : degradação biológica (ERHARDT-ZABIK; WOLT, 1996; US EPA, 1996).

**Citação:** 1- (ADAPAR, 2020a); 2-(TOMLIN, 1994) ; 3- (US EPA, 1996); 4- (ANVISA, 2018); 5- (BOBÉ *et al.*, 1998); 6- (ADAPAR, 2020b); 7- (FAO, 2018).

## **4.2 CAPÍTULO 1: IMPACTOS NA QUALIDADE DA ÁGUA DEVIDO AO USO DE AGROTÓXICOS EM CULTIVOS DE CANA-DE-AÇÚCAR: O QUE UM EXPERIMENTO EM MESOCOSMOS PODE RESPONDER**

### **4.2.1 Design experimental**

O sistema de mesocosmos foi construído no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais/Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (CRHEA/NEEA), da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo (USP), em Itirapina (~ altitude de 731m), São Paulo, Brasil (Figura 3a e 3b). De acordo com a classificação Köppen a região (Cwa) tem verão úmido (de outubro à março) e inverno seco (de abril a setembro) (ALVARES *et al.*, 2013; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2014). A precipitação anual e a evapotranspiração potencial são de 1.500 mm ano<sup>-1</sup>, e entre 500 e 1.000 mm ano<sup>-1</sup>, respectivamente (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2014).



**Figura 3.** a) Mapa do Brasil destacando em cinza o estado de São Paulo; b) Mapa do estado de São Paulo mostrando em um ponto vermelho a localização do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), em Itirapina; c) Foto mostrando a disposição dos mesocosmos no campo; d) Mesocosmo Controle “C1”- réplica um do tratamento sem contaminação; e) Mesocosmo 2,4-D “D2”- réplica dois do tratamento contaminado com  $452 \mu\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D; f) Mesocosmo Fipronil “F1”- réplica um do tratamento contaminado com  $64 \mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; e g) Mesocosmo mistura 2,4-D+Fipronil “M3” – réplica três do tratamento contaminado com  $452 \mu\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D e  $64 \mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil. Foto: Grupo de pesquisa do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA).

Um total de 14 mesocosmos foram construídos com caixas de água circulares de plástico polietileno, com capacidade de 1.500 L, uma altura de 1,05 m, e um diâmetro de topo e de base de 1,85 e 1,43 m, respectivamente. Os mesocosmos foram enterrados com uma borda de ~20 cm acima do nível do solo para permitir a manutenção da temperatura interna e também reduzir a entrada de material alóctone, devido a ação da chuva e do vento. Cada mesocosmo foi preenchido com uma camada de 20 cm de solo natural do próprio local onde o experimento foi desenvolvido, e também com uma coluna de água de 60 cm de água subterrânea (coletada do poço semi artesiano instalado no CRHEA) (Figura 4a). Em cada mesocosmos foram adicionadas: espécies de macrófitas aquáticas proveniente de cultivos do CRHEA, sendo três espécies flutuantes (*Pistia stratiotes* Linnaeus 1753, *Echornia crassipes* (Mart.) Solms-Laubach 1883 (YANG; CHEN; ZHANG, 2014) e *Salvinia auriculata* Aublet 1775 (MILNE; LANG; MURPHY, 2007))

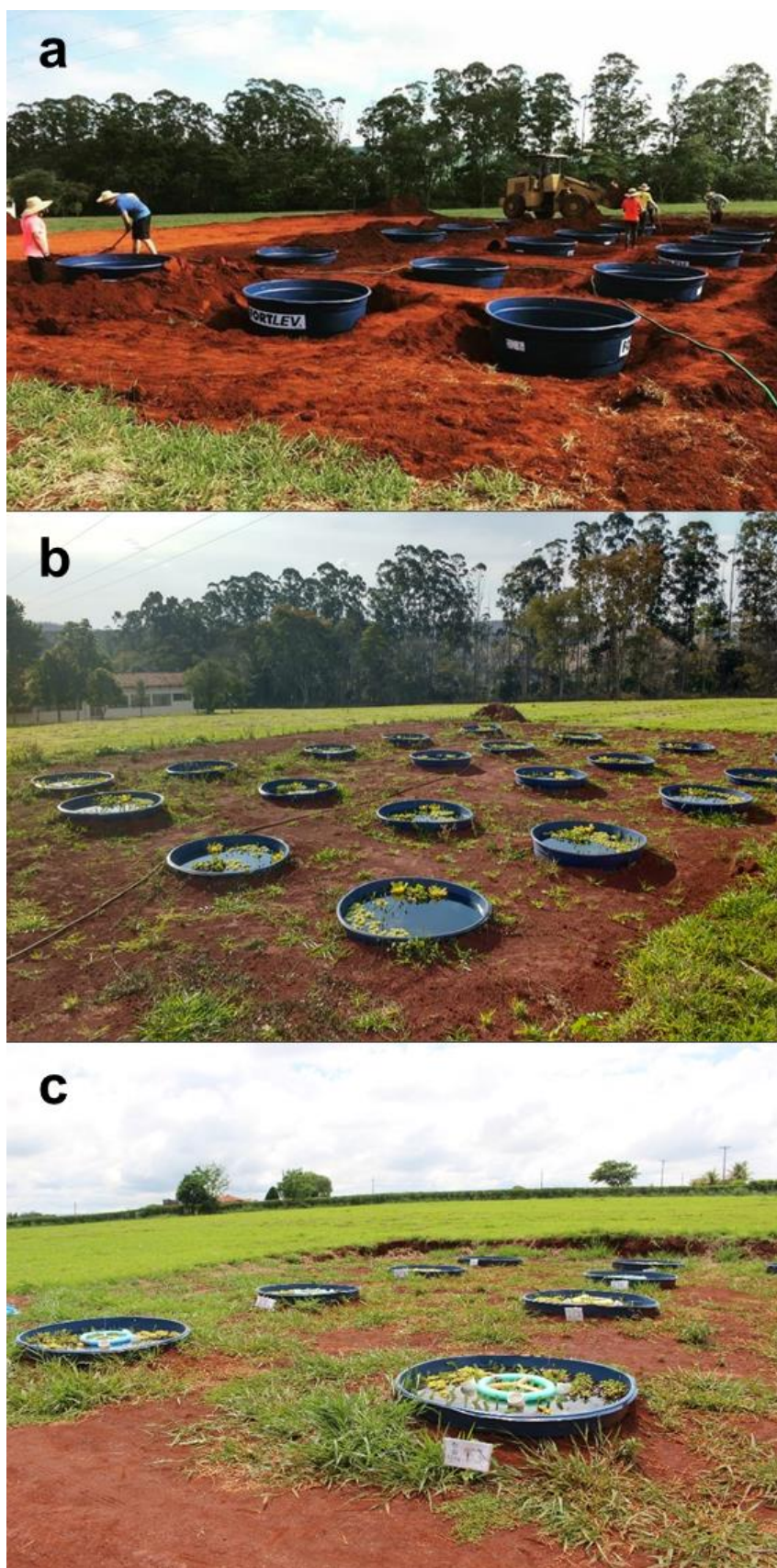
e uma espécie submersa/emergente (*Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdec 1973 (MURPHY, 2007)); e amostras de sedimento contendo fauna bentônica e de água contendo fitoplâncton e zooplâncton, coletadas de unidades experimentais não contaminadas utilizadas em um outro estudo no CRHEA (ler - MOREIRA *et al.* (2017)). Vale ressaltar que as amostras de sedimento e água proveniente das unidades experimentais não contaminadas do estudo de MOREIRA *et al.* (2017) foram uma mistura de materiais originados de três reservatórios: Vinte e Nove (São Carlos, São Paulo), Lagoa Dourada (Itirapina, São Paulo) e Lobo (Broa)(Itirapina, São Paulo). Predadores de topo como peixes não foram acrescentados dentro dos sistemas. Os mesocosmos foram aclimatados por seis meses antes do início do experimento (Figura 4b). Segundo a OECD (2004), o período de aclimação varia conforme o tamanho do sistema e a origem do sedimento e da água introduzida. Assim, o período de seis meses de maturação dos mesocosmos desse estudo foi escolhido para garantir o desenvolvimento de uma comunidade de populações representativas das populações de ambientes aquáticos lênticos em termos de idade e estrutura sexual, já que a água e o sedimento de origem não apresentam as comunidades biológicas referente aos ambientes alvo deste estudo (lagos). Ainda, durante o período de aclimação, devido a estação seca, os mesocosmos eram frequentemente preenchidos com água do poço para manter o nível de água e evitar os efeitos devido a uma alta evaporação.

O poço semi artesianiano do CRHEA está sobre uma área de afloramento do Sistema do Aquífero Guarani (SAG), o qual está localizado na área de drenagem da sub-bacia do Jacaré-Guaçú e tributário do Rio Tietê dentro da bacia hidrográfica do Tietê-Jacaré (CBH DO TIETÊ-JACARÉ, 2019, 2021). A água subterrânea do SAG na área de afloramento (áreas de recarga) é considerada uma água que contém cálcio, magnésio e bicarbonato (Ca-Mg-HCO<sub>3</sub>). Nestas áreas o CO<sub>2</sub> dissolvido é abundante por conta da recarga meteórica, a qual introduz este gás ao SAG (GASTMANS; CHANG; HUTCHEON, 2010). Ainda, estas águas tem um pH baixo e alta concentração de sílica dissolvida (GASTMANS; CHANG; HUTCHEON, 2010).

A bacia hidrográfica do Tietê-Jacaré está dentro do bioma Cerrado (parte da região de Itirapina)(TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2014) com algumas áreas com bioma da Mata atlântica (CBH DO TIETÊ-JACARÉ, 2019). Os solos do Cerrado apresentam baixo pH (entre 4,00 e 5,50), pouco nutriente e baixa fertilidade (SOUSA;

LOBATO, 2004). O solo do CRHEA é classificado como latossolo vermelho distroférico (antiga classificação latossolo roxo), o qual é rico em alumínio e possui alto nível de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (DOS SANTOS *et al.*, 2018; EMBRAPA, 2004; SANTOS; TREVISAN; MOSCHINI, 2018; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2014)(11,06% matéria orgânica; capacidade de troca de cátions (CTC) 3,52 (cmolc/kg); 35% argila, 21% silte, 22% areia fina, 20% areia média, 2% areia grossa (PITOMBEIRA *et al.*, 2020)). Os latossolos são velhos e intemperizados, pois passaram por processos naturais de remoção de  $\text{SiO}_2$  e bases trocáveis (*i.e.*  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{K}^+$ ) do sistema (SOUSA; LOBATO, 2004).





**Figura 4.** Mesocosmos nas fases de: **a)** preparação; **b)** aclimação; e **c)** pós contaminação. Foto: Grupo de pesquisa do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA).

#### 4.2.2 Aplicação dos agrotóxicos

Quatro tratamentos foram selecionados para avaliar o efeito dos agrotóxicos na qualidade da água: **Controle**: com cinco réplicas de tanques sem serem contaminados (Figura 3d); **2,4-D**: com três réplicas de tanques contaminados com a formulação comercial DMA<sup>®</sup> 806 BR (Figura 3e); **Fipronil**: com três réplicas de tanques contaminados com a formulação comercial Regent<sup>®</sup> 800 WG (Figura 3f); e **2,4-D+Fipronil**: com três réplicas de tanques contaminados com as formulações comerciais DMA<sup>®</sup> 806 BR e Regent<sup>®</sup> 800 WG (Figura 3g). A escolha de cinco réplicas de mesocosmos para o tratamento **Controle** foi realizada para evitar a perda de réplicas desse tratamento por meio da contaminação cruzada. Esta estratégia permite que o experimento garanta o número suficiente de réplicas para as análises estatísticas, sem perda do tratamento Controle. As concentrações nominais de 452  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 64  $\mu\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D e fipronil, respectivamente, foram testadas, e elas se basearam tanto na concentração ambiental prevista/*predicted environmental concentrations* (PECs) na água quanto nas doses recomendadas nas instruções de preparação para o estágio pré-emergente de cultivos de cana-de-açúcar (AGROFIT, 2020a, 2020b). Para a aplicação das doses dos agrotóxicos, o diâmetro de topo do tanque foi considerado nos cálculos, portanto, 1 mL de DMA<sup>®</sup> 806 BR (678 mg de i.a. 2,4-D) e 120 mg de Regent<sup>®</sup> 800 WG (96 mg de i.a. fipronil) foram utilizados. Os tratamentos de 2,4-D e Fipronil isolados e em mistura receberam a mesma concentração de seus respectivos contaminantes.

Uma única aplicação de cada contaminante, isolado e em mistura, foi realizada em 26 de novembro de 2018. Cada agrotóxico foi distribuído na superfície da água dos mesocosmos utilizando um balde (um para cada tratamento). Este procedimento visou simular uma aplicação de *overspray*/ ou pulverização com os agrotóxicos, os quais são realizados nos cultivos de cana-de-açúcar (AGROFIT, 2020a, 2020b). Para evitar a contaminação cruzada, os mesocosmos do Controle foram cobertos com uma tampa de plástico durante a aplicação e depois da aplicação os mesmos foram retirados.

### 4.2.3 Variáveis abióticas e climatológicas

Para permitir a avaliação das mudanças limnológicas nos mesocosmos desde a aplicação dos agrotóxicos e ao longo da degradação/ ou depuração dos mesmos, o experimento teve uma duração de 73 d após a contaminação dos sistemas.

Assim, as medidas das variáveis físicas e químicas foram realizadas durante o período da manhã (8 – 10 h) nos dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 (esta sequência é referente ao dia da contaminação que foi considerada como o dia 0). As medidas de potencial de hidrogênio (pH), oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE) e turbidez (Turb) foram adquiridas através do uso de um multiparâmetro (YSI- ProDSS); sendo que clorofila *a* (Cla) e *b* (Clb) foram quantificadas utilizando um medidor de clorofila (Aquafluor). Amostras de água de 250 mL, com três réplicas para cada coleta e cada mesocosmos, foram coletadas em garrafas plásticas não tóxicas para determinar a concentração de nutrientes. As concentrações dos seguintes nutrientes foram analisadas em um espectrofotômetro (Shimadzu- UV-2101PC): nitrogênio total de Kjeldahl (NTK)(KJELDAHL, 1883); fósforo total (PT), fosfato total dissolvido (PTD), fosfato inorgânico (PI) (APHA, 1995), nitrito (NO<sub>2</sub>), silicato reativo (SiO<sub>2</sub>) (GOLTERMAN; CLYMO; OHNSTAD, 1978), nitrato (NO<sub>3</sub>) (MACKERETH; HERON; TALLINNG, 1978), e íon amônio (NH<sub>4</sub>) (KOROLEFF, 1976).

Para a quantificação dos agrotóxicos, amostras de água (1 L) foram coletadas de cada mesocosmos nos dias 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73. Já para o metal total, as amostras de água (1 L) de cada mesocosmos foram coletadas nos dias 0 e 2, uma vez que não era esse o objetivo principal da pesquisa (neste caso, a análise foi feita apenas para verificar se a adição dos agrotóxicos contribuiria ou não para o aumento da concentração de metais nos mesocosmos, uma vez que em sua composição existem traços de alguns metais (IBAMA, 2019a, 2019b)). O metal total inclui todos os metais, com ligações inorgânicas ou orgânicas,, tanto dissolvido quanto particulado (GOVERNMENT OF BRITISH COLUMBIA, 2017). As amostras de agrotóxicos foram estocadas em garrafas de vidro âmbar, enquanto as amostras de metais foram estocadas em garrafas de plástico não tóxicas. As amostras de metais passaram por um processo de digestão com ácido (HNO<sub>3</sub>) para a extração dos metais (US EPA, 1992).

A quantificação química dos agrotóxicos foi realizada no Instituto de Química, da Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, através de um Cromatógrafo Líquido acoplado com Espectrometria de Massa em Tandem (LC-MS/MS) usando um cromatógrafo Agilent 1200. Os compostos foram identificados e quantificados por espectrometria em massa em um instrumento Agilent 6410B triplo quadrupolo com uma fonte de ionização por *electrospray*. O limite de quantificação (LOQ) foram 5,00 ng L<sup>-1</sup> para 2,4-D e 0,10 ng L<sup>-1</sup> para fipronil. A análise físico-química de degradação e decaimento dos agrotóxicos nos mesocosmos fez parte do trabalho de doutorado da discente Bianca V. Goulart, do Instituto de Química, da Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, no qual esses mecanismos serão detalhados e aprofundados. Os metais foram quantificados por espectroscopia de emissão atômica de plasma de micro-ondas (MP-AES 4200, Agilent Technologies) no Departamento de Ciências Ambientais, da Universidade Federal de São Carlos, em Socoraba, São Paulo. No apêndice A1 estão apresentados os detalhes dos comprimentos de onda (nm), os limites de detecção (LOD) e de LOQ dos metais analisados (Al- Alumínio; Ba- Bário; Cd- Cádmio; Co- Cobalto; Cr- Cromo; Cu- Cobre; K- Potássio; Mn- Manganês; Mo- Molibdênio; Ni- Níquel; Pb- Chumbo; Sr- Estrôncio; e Zn- Zinco) (HAGE; CARR, 2012).

Os dados climatológicos (temperatura do ar, temperatura da água, radiação, velocidade do vento em 2,00 m de altura, precipitação e evaporação) foram obtidos nos mesmos dias das coletas, na Estação Climatológica do CRHEA.

#### **4.2.4 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software R version 4.2.1 (R CORE TEAM, 2022) com uso do Rstudio version 2022.07.1+554© 2009-2022.

A estatística descritiva dos valores médios e desvios padrão das variáveis físicas e químicas, e dos dados climatológicos foram representados em gráficos considerando os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73, avaliando-se os efeitos da contaminação sobre os mesocosmos.

As variações espaciais e temporais das variáveis físicas e químicas e dos nutrientes dos mesocosmos foram avaliadas para os dias 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 através de Análises de Componentes Principais/ *Principal Component Analysis* (PCA) utilizando o

pacote “FactoMineR” (LÊ; JOSSE; HUSSON, 2008). Para os metais dos mesocosmos as variações espaciais e temporais foram realizadas por meio da PCA nos dias 0 e 2. As componentes principais/ principal components (PC) mais significativas na representação dos dados foram avaliadas através da análise *Parallel* utilizando o pacote “psyc” (REVELLE, 2022). A soma das PCs retidas pela análise *Parallel* foi considerada para os próximos passos quando ela fosse maior que 60%, do contrário, mais PCs eram adicionadas até que a soma da contribuição atingisse esse valor. A quantidade de *Load* e o coeficiente dos *Scores* de cada fator foi transformado graficamente para visualização através do pacote “factoextra” (KASSAMBARA; MUNDT, 2020). Os gráficos dos *Scores* das PCs para análise temporal de cada mesocosmos individualmente, gráficos dos *Scores* médios ao longo do tempo para cada tratamento, gráficos da estatística descritiva e os mapas foram preparados usando o pacote “ggplot2” (WICKHAM *et al.*, 2022a). Os *Shapes* dos mapas foram obtidos por meio dos pacotes “rnaturalearth” (SOUTH, 2017) e “devtools” (WICKHAM *et al.*, 2022b).

### **4.3 CAPÍTULO 2: COMUNIDADE ZOOPLÂNTONICA COMO BIOINDICADORA DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE 2,4-D E FIPRONIL, ISOLADOS E EM MISTURA**

Para avaliar mudanças na estrutura e na densidade da comunidade zooplânctônica, desde a aplicação dos agrotóxicos e ao longo da degradação/ ou depuração dos mesmos, bem como o tempo de recuperação dos grupos afetados, o experimento teve uma duração de 73 d após a contaminação dos sistemas.

Assim, amostras de zooplâncton foram coletadas em todos os mesocosmos de todos os tratamentos nos dias 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 após a contaminação. Uma alíquota de 15 L de água foi amostrada de cada um dos mesocosmos utilizando um balde (um para cada tratamento, evitando-se a contaminação cruzada). Cada amostra foi filtrada, utilizando uma rede com abertura de malha de 45  $\mu\text{m}$ , concentrada e preservada em um frasco de vidro com formaldeído 4% misturado com açúcar.

As amostras foram analisadas em laboratório para avaliar os efeitos dos tratamentos na comunidade do zooplâncton. Os organismos foram identificados a nível de grandes grupos. Cladocera e Copepoda foram identificados e contabilizados em microscópio estereoscópio (Nikon SMZ445) por meio de subamostras de 10% - 60%. Rotífera e náuplios de Copepoda, foram identificados e contabilizados utilizando um microscópio binocular (LEICA DMLS) com magnificação de 100X por meio de subamostras de 1 mL utilizando uma câmara de *Sedgewick-Rafter*.

#### **4.3.1 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas no R version 4.2.1 (R CORE TEAM, 2022) com o Rstudio version 2022.07.1+554© 2009-2022. A estatística descritiva dos valores médios e desvios padrão da densidade ( $\text{ind L}^{-1}$ ) ao longo do tempo para cada grupo, em cada tratamento, foram representadas em gráficos de linhas. Para a densidade numérica ( $\text{ind L}^{-1}$ ) e densidade relativa (%) os valores médios foram inseridos em gráficos de barras para cada coleta, agrupados em tratamentos. Esses gráficos foram produzidos para auxiliar na análise dos efeitos dos agrotóxicos após a contaminação. Para descrever a variação da densidade de organismos entre as réplicas de mesocosmos de cada

tratamento, um gráfico de linhas para cada tratamento ao longo do tempo foi feito com os valores calculados do coeficiente de variação (C.V.) (%) da densidade de Cladocera, Copepoda e Rotífera.

Para avaliar a resposta da abundância de Cladocera, Copepoda e Rotífera aos efeitos (como efeitos fixos) dos tratamentos, variáveis físicas e químicas, dias e  $\log_{(\text{comunidade}+1)}$  (representando o efeito da comunidade), modelos lineares generalizados mistos (GLMM) foram desenvolvidos utilizando o pacote “lme4” (BATES *et al.*, 2015). Mesocosmos e dias foram modelados como efeitos aleatório. Como as variáveis físicas e químicas foram coletadas em um período mais longo que as do zooplâncton, foi feito um subconjunto dos dados dessas variáveis para coincidir com o mesmo período das coletas de zooplâncton, assim uma nova PCA foi desenvolvida para permitir a estimativa dos efeitos dessas variáveis na abundância dos grandes grupos do zooplâncton nos modelos GLMM. Os valores de metais não foram considerados, uma vez que somente foram quantificados nos dias 0 e 2, não descrevendo a concentração dos metais nas demais coletas. As variações espaciais e temporais das variáveis físicas e químicas dos mesocosmos, bem como as PCs mais significativas e os gráficos apresentados nesse capítulo seguiram a mesma metodologia da seção 4.2.4 das análises estatísticas do Capítulo 1.

As distribuições Poisson e Binomial Negativa com função de ligação log, e a distribuição Log gaussiana com função de ligação identidade foram testadas. Os diagnósticos de resíduos dos modelos completos foram comparados para a escolha da melhor distribuição e do melhor modelo. Após esta etapa, a significância dos efeitos fixos nos modelos foram realizados por meio da comparação do critério de informação de Akaike/ *Akaike information criterion* (AIC) corrigido para amostras-pequenas (AICc) entre o modelo completo e os modelos reduzidos (HOBBS; HILBORN, 2006). A diferença do AICc entre os modelos foi considerada significativa quando ela fosse maior ou igual a dois (BURNHAM; ANDERSON, 2004). Os ajustes dos modelos foram analisados através de gráficos de diagnósticos de resíduos. As diferenças dos efeitos fixos na abundancia dos organismos foi considerada significativa quando o *p*-valor foi menor que 0,05.

#### 4.4 **CAPÍTULO 3: OS EFEITOS AGUDOS DE FIPRONIL E 2,4-D, ISOLADOS E EM MISTURA: UMA AMEAÇA AO COPÉPODE CALANOIDA DE ÁGUA DOCE *Notodiaptomus iheringi***

##### 4.4.1 **Manutenção e Cultivo do organismo-teste *Notodiaptomus iheringi***

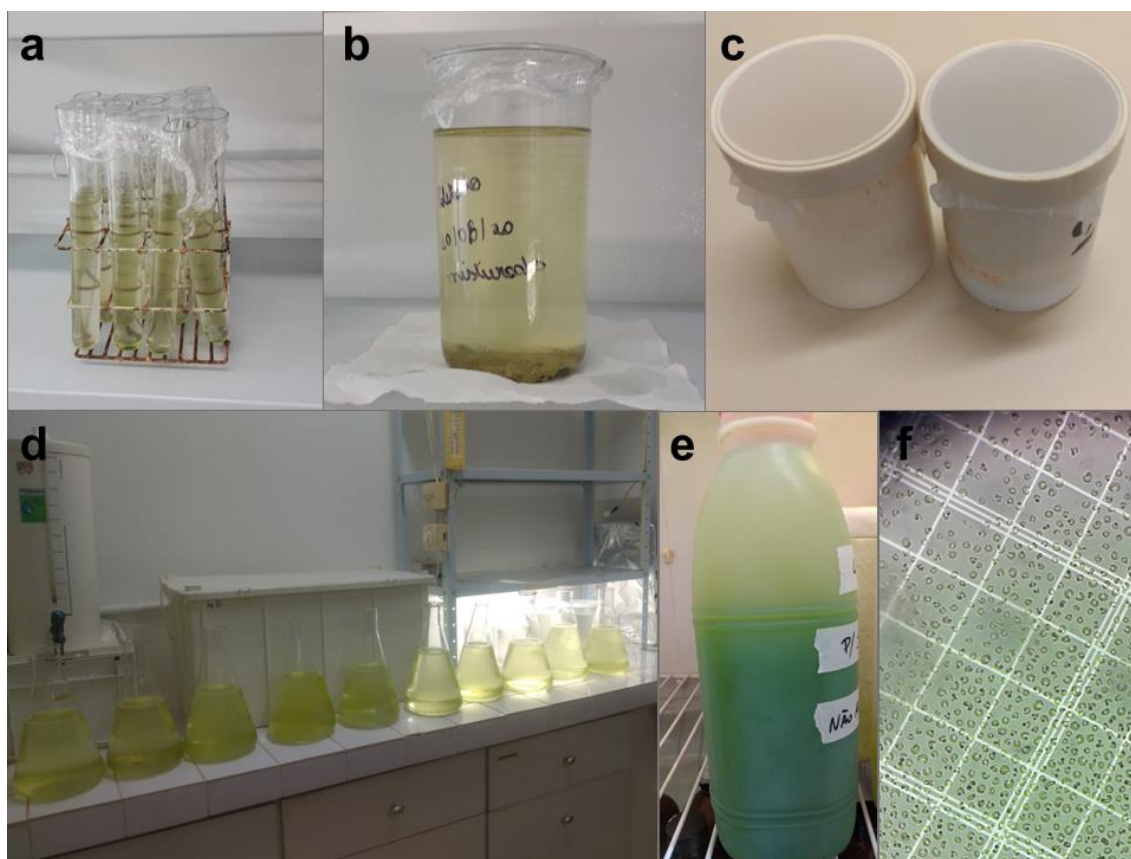
Os cultivos e os testes foram desenvolvidos no CRHEA/NEEA. Amostras de zooplâncton foram coletadas no Reservatório do Lobo (Broa), Itirapina, São Paulo, Brasil (22°11'33.1"S, 47°53'16.8"O) utilizando uma rede de plâncton com abertura de malha de rede de 45 µm, e levadas ao laboratório. Fêmeas ovadas de Calanoidas foram separadas sob visualização de um microscópio estereoscópio (Olympus Tokyo SZ Japan) para permitir o isolamento das espécies. As fêmeas ovadas foram colocadas individualmente em tubos de ensaios contendo 60 mL de água filtrada (em rede de abertura de malha 20 µm) do Reservatório do Lobo para a eclosão de náuplios e a aclimação dos organismos (Figura 5a). O meio de cultivo foi renovado até os copépodos atingirem o estágio adulto (~15 d). Após esta etapa, um macho de cada tubo de ensaio foi sacrificado para a identificação da espécie (SANTOS-SILVA, 1998). Todos os copépodos *N. iheringi* foram colocados juntos em um *Becker* de 1 L (Figura 5b) contendo 1 L de água filtrada do Reservatório do Lobo e sequencialmente após uma semana em um *Erlenmeyer* contendo 2 L do mesmo meio, para permitir o crescimento da população. O meio de cultivo dos copépodos foi sendo trocado gradativamente por meio de misturas de água do Reservatório do Lobo com proporções de água reconstituída (10, 25, 50,75 %) (Dureza: 40-48 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>; pH: 7-7,6; e EC: ~160 µS cm<sup>-1</sup>) (ABNT, 2017) nos dias em que eram realizadas as manutenções dos cultivos (Figura 5C). Assim, somente a água reconstituída foi utilizada nos cultivos (2 L cada cultivo). O meio foi renovado a cada dois ou três dias e misturado com alga da espécie *Raphidocelis* (= *Pseudokircheneriella*) *subcapitata* (Korshikov) F. Hindák 1990) em uma densidade de 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> para a alimentação dos organismos (ESPÍNDOLA, 1994). As algas foram cultivadas em meio LC Oligo (Figura 5e e 5f)(ABNT, 2016).

Para estimar a idade dos copépodos, um novo cultivo com náuplios foi estabelecido em cada dia em que o meio era renovado. Cada cultivo foi filtrado usando uma rede de 500 µm para separar adultos e copepoditos dos náuplios. Os náuplios eram



novamente filtrados em uma rede de 20  $\mu\text{m}$ . Esta escolha se deu devido ao tamanho dos organismos - comprimento total médio de *N. iheringi* é: 202,29-328,26  $\mu\text{m}$  para náuplios I-VI; 436-804  $\mu\text{m}$  para copepoditos I-V; 1.030  $\mu\text{m}$  para macho; e 1.240  $\mu\text{m}$  para fêmea (OKUMURA, 2011). Somente organismos de 20 d ou mais foram utilizados nos testes. Os cultivos com mais de 30 d eram descartados. Os cultivos foram mantidos em sala climatizada em temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12:12 h (claro:escuro).

Após seis meses em que os cultivos foram aclimatizados nas condições do laboratório, mensalmente foram realizados testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl), com o objetivo de avaliar a sensibilidade da população dos copépodos cultivados (OKUMURA, 2011; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008), obtendo-se a  $CL_{50}$  de *N. iheringi* a NaCl referente ao tempo de duração do teste (48 h). Esta substância foi escolhida por ser uma substância de referência tradicionalmente utilizada em testes de sensibilidade, além do fato dessa espécie de copépodo já ter apresentado uma elevada sensibilidade a este sal (OKUMURA, 2011). Esses testes foram realizados com no mínimo cinco concentrações da solução teste, as quais foram estabelecidas conforme OKUMURA (2011): controle; 0,25  $\text{g L}^{-1}$ ; 0,75  $\text{g L}^{-1}$ ; 1,25  $\text{g L}^{-1}$ ; 2,25  $\text{g L}^{-1}$ ; e 3,25  $\text{g L}^{-1}$ .



**Figura 5.** Processos para o estabelecimento do cultivo de *Notodiaptomus iheringi* em laboratório. **a)** Isolamento de fêmeas ovadas de Calanoida, coletadas do ambiente, em tubos de ensaio; **b)** Cultivos de 1 L com alguns organismos de *N. iheringi* para permitir o crescimento da população; **c)** Redes utilizadas para a manutenção dos cultivos; **d)** Manutenção dos cultivos de *N. iheringi* já sincronizados por idade; **e)** Recipiente com meio algal (*Raphidocelis subcapitata*) em uma densidade de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  para alimentar os organismos do cultivo; e **f)** Contagem de células de *R. subcapitata* em câmara de Neubauer sob microscópio para a estimativa da densidade de algas para a alimentação.

#### 4.4.2 Preparação das soluções de agrotóxicos e medidas das variáveis físicas e químicas

As soluções estoques foram preparadas utilizando água destilada com uma concentração de  $0,80 \text{ mg L}^{-1}$  de fipronil medido como Regent 800<sup>®</sup> WG, e  $2 \times 10^4 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D medido como DMA 806<sup>®</sup> BR. Entretanto, os resultados estão representados como i.a. fipronil e 2,4-D, já que eles foram os compostos quantificados.

As soluções testes foram preparadas com água reconstituída misturada com/ou sem agrotóxico nas concentrações de seus respectivos tratamentos. Os valores de pH inicial (pHgâmetro B374 - Micronal), DO (Oxímetro - YSI 55) e EC (Orion 145), bem como os valores finais de pH e DO foram medidos em todos os testes (ABNT, 2017). Como ainda não existe um protocolo oficial para testes ecotoxicológicos com copépodos

de água doce, a avaliação das variáveis físicas e químicas seguiram o protocolo da ABNT (2017).

#### **4.4.3 Testes de toxicidade com os agrotóxicos isolados**

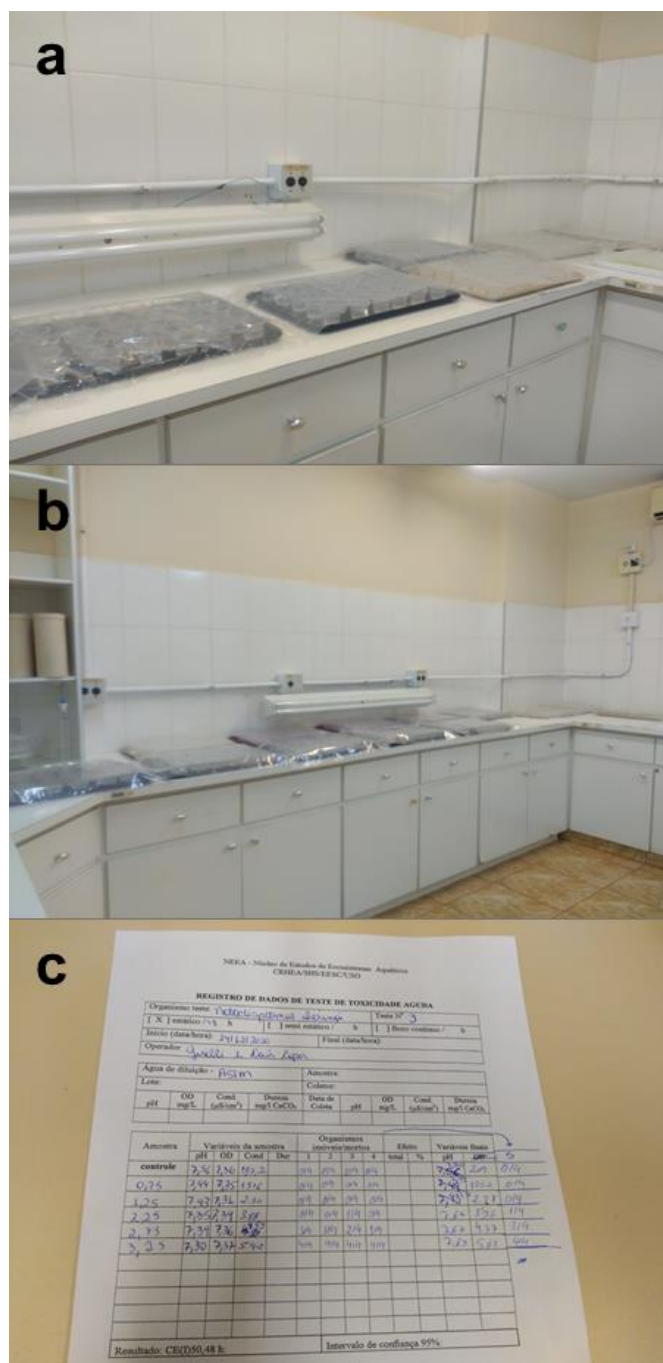
Para cada agrotóxico isolado, seis tratamentos foram realizados para avaliar a toxicidade aguda em adultos de *N. iheringi*. Para Regent 800<sup>®</sup> WG as concentrações nominais foram: **Cr**: controle sem fipronil; **R1**: 1,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R2**: 3,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R3**: 6,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R4**: 12,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; e **R5**: 24,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil. Para DMA 806<sup>®</sup> BR as concentrações nominais foram: **Cd**: controle sem 2,4-D; **D1**: 420  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; **D2**: 480  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; **D3**: 540  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; **D4**: 600  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D; e **D5**: 660  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D. Estas concentrações foram selecionadas baseadas em testes preliminares.

Cada unidade experimental (UE) recebeu quatro adultos (duas fêmeas sem ovos e dois machos, respeitando-se a razão sexual 2:2) em uma densidade de 1 organismo  $10\text{ ml}^{-1}$ , considerando cinco réplicas por tratamento. As UEs foram cobertas e as condições de teste foram as mesmas do cultivo (secção 4.4.1). Os testes tiveram uma duração de 48 h, foram estáticos e sem alimentação (ISO 14669, 1999). Ao final do experimento, o número de organismos mortos foi contabilizado. Os organismos foram considerados mortos quando não apresentassem nenhum movimento após estímulo físico. Os testes foram validados com no máximo 10% de mortalidade nos controles (ISO 14669, 1999). Os experimentos foram realizados em triplicatas (três experimentos para cada um dos agrotóxicos) (Figura 6a).

#### **4.4.4 Teste de toxicidade com a mistura dos agrotóxicos**

Para a mistura dos agrotóxicos, 17 tratamentos foram realizados para avaliar a toxicidade aguda nos adultos de *N. iheringi* com as seguintes concentrações nominais: **Cm**: controle sem agrotóxicos; **R1**; **R2**; **R3**; **R4**; **R5**; **D1**; **D2**; **D3**; **D4**; **D5**; **M1**: R1 com D1; **M2**: R1 com D5; **M3**: R3 com D1; **M4**: R3 com D5; **M5**: R5 com D1; e **M6**: R5 com D5. Tanto os procedimentos quanto as condições dos testes foram as mesmas descrita anteriormente na secção 4.4.3 (*Testes de toxicidade com os agrotóxicos isolados*). Este

experimento foi feito apenas uma vez (SILVA *et al.*, 2020). Figura 6b. As combinações selecionadas derivaram dos resultados dos testes de toxicidade com os agrotóxicos isolados.



**Figura 6.** a) Bandejas com as unidades experimentais do teste de toxicidade com os agrotóxicos isolados; b) Bandejas com as unidades experimentais do teste de toxicidade com a mistura dos agrotóxicos; e c) folha de teste.

#### 4.4.5 Teste de pós-exposição

Após cada teste (secções 4.4.3 e 4.4.4), para avaliar a recuperação dos organismos após serem sido expostos por 48 h aos agrotóxicos, ao menos dez organismos sobrevivente por concentração foram lavados três vezes com água reconstituída (GER; TEH; GOLDMAN, 2009) e transferidos para uma nova UE com um novo meio de água reconstituída sem agrotóxicos. Os dez organismos sobreviventes foram distribuídos em quatro, três e três conjuntos de copéodos por UE, respectivamente, contabilizando três réplicas por tratamento. Para avaliar a taxa de alimentação (TA) de *N. iheringi* após a exposição, algas foram adicionadas ao meio de água reconstituída. As condições do experimento bem como a concentração das algas seguiram as mesmas do cultivo (secção 4.4.1). As UEs tiveram uma densidade de 1 organismo 10 mL<sup>-1</sup>, e três UEs foram utilizadas como branco (sem organismo) para medir a concentração inicial e final das algas (MCWILLIAM; BAIRD, 2002). Os testes tiveram uma duração de 4 h no escuro (LOPES *et al.*, 2007). Três alíquotas de 2 mL foram retiradas de cada UE, depositadas em tubos de *Eppendorf*, e fixadas com Lugol, no começo e no final do teste. A TA foi medida utilizando uma câmara de *Neubauer* baseada nas diferenças entre as concentrações final e inicial das algas e calculada de acordo com Frost (1972).

$$TA = \frac{(C - T) \times V}{N} \quad (1)$$

$$C = \frac{\ln(Ct) - \ln(C0)}{t} \quad (2)$$

$$T = \frac{\ln(Tt) - \ln(T0)}{t} \quad (3)$$

Onde TA é a taxa de alimentação. Ct, C0, Tt, e T0 são as concentrações de células de algas no branco (C) e nos tratamentos (T), ao final (t) e ao início (0) do experimento. t é o período de tempo do experimento; V é o volume do meio e N é o número de copéodos. As TA negativas foram interpretadas como ingestão igual a zero ou que não houve ingestão (NEJSTGAARD; GISMERVIK; SOLBERG, 1997). A sobrevivência dos copéodos também foi avaliada.

#### 4.4.6 Quantificação química

A metodologia da quantificação dos agrotóxicos seguiu a mesma da secção 4.2.3 do Capítulo 1. Com exceção dos LOQs, os quais foram 0,5 e 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para fipronil e 2,4-D, respectivamente, para o experimento em laboratório.

#### 4.4.7 Análises estatísticas

Os dados dos testes com os agrotóxicos isolados e os de pós-exposição foram analisados por meio do software R version 4.2.1 (R Core Team 2022) com uso do Rstudio version 2022.07.1+554© 2009-2022.

A  $CL_{10}$ ,  $CL_{20}$ , e  $CL_{50}$  dos copépodos com valores com 95% de intervalo de confiança, foram derivados do modelo dose-resposta utilizando um modelo log-logístico com 2-parâmetros do pacote “drc” (RITZ *et al.*, 2015).

Para testar por diferenças na mortalidade e na TA, o modelo linear generalizado (GLM) foi desenvolvido. A distribuição Binomial com função de ligação logit e a distribuição Gaussiana com função de ligação identidade foram aplicadas, respectivamente.

Os modelos conceituais de ação independente/*independent action* (AI) e de adição de concentração/*concentration addition* (AC) através da ferramenta MIXTOX (JONKER *et al.*, 2005) foram usados para analisar os efeitos na mortalidade do teste de toxicidade aguda com as misturas dos agrotóxicos. Estes dois modelos foram estendido por meio dos desvios de sinergismos/antagonismo/*synergism/antagonism* (S/A), dependente da razão de dose/*dose ratio-dependent* (DR), e dependente do nível de dose/ *dose level-dependent* (DL) (JONKER *et al.*, 2005). A significância dos ajustes dos modelos foi analisada por meio de testes de razão de verossimilhança (JONKER *et al.*, 2005). O MIXTOX calculou também a concentração de efeito da mistura para 50% dos copépodos ( $CE_{50}$ )

As análises foram realizadas usando as concentrações quantificadas de cada tratamento a partir das análises de quantificação química. As diferenças foram significantes quando o *p*-valor foi menor que 0,05.

## 5 REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp. (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2016. 21 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373:2016. **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017.

ADAPAR - AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Bula Regent® 800 WG**, 2020a. Disponível em: [www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos\\_restritos/files/documento/2021-01/regent800wg.pdf](http://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2021-01/regent800wg.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2022.

ADAPAR - AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Bula DMA® 806 BR**, 2020b. Disponível em: [https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-11/dma\\_806\\_br\\_2011.pdf](https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-11/dma_806_br_2011.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2022.

AGROFIT - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Bula Regent® 800 WG**. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 19 maio. 2020a.

AGROFIT - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Bula DMA ® 806 BR**. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 18 maio. 2020b.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES GONÇALVES, J. L.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Índice monográfico F43 fipronil**, 2018. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/f43.pdf/cee42727-46ab-44a2-b88e-10ea4e8faab9>>. Acesso em: 3 out. 2018.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington: American Public Health Association, 1995.

BATES, D.; MÄCHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. Fitting linear mixed-effects models using Lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, p. 1–48, 2015.

BOBÉ, A.; MEALLIER, P.; COOPER, J.-F.; COSTE, C. M. Kinetics and mechanisms of abiotic degradation of fipronil (hydrolysis and photolysis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2834–2839, 1998.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. (ed.). **Model Selection and Multimodel Inference**. New York, NY: Springer, 2004. 488 p.

CBH DO TIETÊ-JACARÉ- COMITÊS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO TIETÊ-JACARÉ. **Relatório de situação dos recursos hídricos 2019: UGRHI 13 - Bacia hidrográfica Tietê- Jacaré (Ano base 2018)**. Comitês da Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré, 2019. Disponível em: <<https://dspace.ana.gov.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/9462/Relatorio%20situacao%202019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

CBH DO TIETÊ-JACARÉ- COMITÊS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO TIETÊ-JACARÉ. **Estudo da disponibilidade hídrica subterrânea na área de afloramento do sistema aquífero guarani nas sub-bacias do Jacaré-guaçu e Jacaré-Pepira, UGRHI 13**. CBH do Tietê-Jacaré- Comitês da Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré, 2021. Disponível em: <<https://sigrh.sp.gov.br/public/uploads/deliberation//CBH-TJ/21371/deliberacao-cbh-tj-15-de-10-12-2021-aprova-tr-estudo-da-disponibilidade-hidrica-subterranea-na-area-de-afloramento.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2022.



- DOS SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P.; DOS ANJOS, L. H. C.; DE OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; DE ALMEIDA, J. A.; DE ARAUJO FILHO, J. C.; DE OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Brazilian Soil Classification System**. Brasília: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018. 345 p.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. XXXII Reunião de pesquisa de soja da região sul: Indicações técnicas para a cultura de soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina – 2004/2005. Em: 2004, Passo Fundo, RS. Passo Fundo, RS: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2004. v. 32, p. 170.
- ERHARDT-ZABIK, S.; WOLT, J. D. Design and interpretation of herbicide anaerobic aquatic metabolism studies. **Weed Technology**, v. 10, n. 1, p. 191–201, 1996.
- ESPÍNDOLA, E. L. G. **Dinâmica da associação congênica das espécies de Notodiaptomus (Copepoda, Calanoidea) no reservatório de Barra bonita, São Paulo**. Universidade de São Paulo, São Carlos, 1994.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **2,4-D**, 2018. Disponível em: <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation98/24deval.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation98/24deval.pdf)>. Acesso em: 3 out. 2018.
- FROST, B. W. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. **Limnology and Oceanography**. v. 17, p. 805–815, 1972.
- GASTMANS, D.; CHANG, H. K.; HUTCHEON, I. Groundwater geochemical evolution in the northern portion of the Guarani Aquifer System (Brazil) and its relationship to diagenetic features. **Applied Geochemistry**, v. 25, n. 1, p. 16–33, 2010.
- GER, K. A.; TEH, S. J.; GOLDMAN, C. R. Microcystin-LR toxicity on dominant copepods *Eurytemora affinis* and *Pseudodiaptomus forbesi* of the upper San

Francisco Estuary. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 17, p. 4852–4857, 2009.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for Physical and Chemical Analysis of Fresh Waters**. Oxford: Blackwell Scientific, 1978. 213 p.

GOVERNMENT OF BRITISH COLUMBIA. **Digestion for total metals in water - prescriptive**. Disponível em: <ring-and-reporting/monitoring/emre/methods/sept2017/>. Acesso em: 28 fev. 2022.

GUNASEKARA, A. S.; TRUONG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 3, p. 189–199, 2007.

HAGE, D. S.; CARR, J. D. **Química Analítica e Análise Quantitativa**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2012. 724 p.

HOBBS, N. T.; HILBORN, R. Alternatives to statistical hypothesis testing in ecology: a guide to self teaching. **Ecological Applications**, v. 16, n. 1, p. 5–19, 2006.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Perfil ambiental 2,4-D (ácido): CAS 94-75-7**, 2019a. Disponível em: <[https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20-%2024-D%20cido%20-%2002\\_10\\_2019.pdf](https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20-%2024-D%20cido%20-%2002_10_2019.pdf)>. Acesso em: 27 dez. 2022.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Perfil ambiental Fipronil: CAS 120068-37-3**, 2019b. Disponível em: <[https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20-%20Fipronil%20-%2002\\_10\\_2019.pdf](https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20-%20Fipronil%20-%2002_10_2019.pdf)>. Acesso em: 27 dez. 2022.

- ISO 14669 - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.  
**Water quality - Determination of Acute Lethal Toxicity to Marine Copepods (Copepoda, Crustacea)**. Geneva: International Organization for Standardization, 1999. 16 p.
- JONKER, M. J.; SVENDSEN, C.; BEDAUX, J. J. M.; BONGERS, M.; KAMMENGA, J. E. 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.
- KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses R package version 1.0.7., 2020. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>>. Acesso em: 16 ago. 2020.
- KENNEPOHL, E.; MUNRO, I. C.; BUS, J. S. Phenoxy herbicides (2,4-D). *Em*: KRIEGER, R. **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**. Riverside: Academic Press, 2010. p. 1829–1841.
- KJELDAHL, J. Neue Methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern. **Zeitschrift für analytische Chemie**, v. 22, n. 1, p. 366–382, 1883.
- KOROLEFF, F. Determination of nutrients. *Em*: GRASSHOF, E.; KREMLING, E. **Methods the Seawater Analysis**. New York: Verlag Chemie Weinheim, 1976. p. 117–181.
- LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, p. 1–18, 2008.
- LOPES, I.; MOREIRA-SANTOS, M.; DA SILVA, E. M.; SOUSA, J. P.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. In Situ assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. **Chemosphere**, v. 67, n. 11, p. 2250–2256, 2007.
- MACKERETH, S. J.; HERON, J.; TALLINNG, J. S. **Water Analysis some Revised Methods for Limnology**. Cumbria: Freshwater Biological Association, Scientific Publication, 1978.

- MARTINS, J.; OLIVA TELES, L.; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. **Environment International**, v. 33, n. 3, p. 414–425, 2007.
- MCWILLIAM, R. A.; BAIRD, D. J. Postexposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1198–1205, 2002.
- MILNE, J.; LANG, P.; MURPHY, K. Competitive interactions between *Salvinia auriculata* aubl., *Limnobium laevigatum* (humb. and bonpl. ex willd.) heine, and other free-floating aquatic macrophytes under varying nutrient availability. **Fundamental and Applied Limnology**, v. 169, n. 2, p. 169–176, 2007.
- MOREIRA, R. A.; DAAM, M. A.; VIEIRA, B. H.; SANCHES, A. L. M.; REGHINI, M. V.; DA SILVA MANSANO, A.; DE FREITAS, E. C.; ESPINDOLA, E. L. G.; ROCHA, O. 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, 2017.
- MURPHY, K. *Myriophyllum aquaticum* (parrot's feather). **CABI Compendium**, v. CABI Compendium, p. 34939, 2007.
- NEJSTGAARD, J. C.; GISMERVIK, I.; SOLBERG, P. T. Feeding and reproduction by *Calanus finmarchicus*, and microzooplankton grazing during mesocosm blooms of diatoms and the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 147, n. 1/3, p. 197–217, 1997.
- OECD- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Draft guidance document on simulated freshwater lentic field tests (outdoor microcosms and mesocosms)**. Organization for Economic Cooperation and Development, 2004. Disponível em: <<https://www.oecd.org/fr/securitechimique/essais/32612239.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2023.

- OKUMURA, D. T. **Estudos ecotoxicológicos com as espécies *Argyrodiaptomus furcatus* e *Notodiaptomus iheringi* (Copepoda, Calanoida)**. Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-15032011-140613/>>. Acesso em: 13 jul. 2022.
- PITOMBEIRA, F. L.; ATHAYDE, D. B.; DAAM, M. A.; VAN GESTEL, C. A. M.; GUERRA, G. da S.; DUARTE-NETO, P. J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. 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, 2020.
- R CORE TEAM. **R: a Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2022.
- REVELLE, W. **psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research**. Evanston, Illinois, USA. Northwestern University, 2022. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=psych>>. Acesso em: 29 set. 2022.
- RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0146021, 2015.
- SANTOS, B. F. dos; TREVISAN, D. P.; MOSCHINI, L. E. Caracterização ambiental da paisagem do município de Itirapina/SP. **Revista Hipótese**, v. 4, n. 2, p. 56–76, 2018.
- SANTOS-SILVA, E. N. Maxillopoda - Copepoda. Freshwater Calanoida. *Em*: YOUNG, P. S. **Catalogue of Crustacea of Brazil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998. p. 201–220.
- SILVA, L. C. M.; MOREIRA, R. A.; PINTO, T. J. S.; OGURA, A. P.; YOSHII, M. P. C.; LOPES, L. F. P.; MONTAGNER, C. C.; GOULART, B. V.; DAAM, M. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology**, 2020.

- SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. **Cerrado: Correção do Solo e Adubação**. Brasília, Brasil: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2004. 416 p.
- SOUTH, A. **rnaturalearth: world map data from natural earth**, 2017. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=rnaturalearth>>. Acesso em: 29 set. 2022.
- TOMLIN, C. **The Pesticide Manual**. UK: British Crop Protection Council, 1994. 1341 p.
- TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. The ecology of UHE Carlos Botelho (Lobo-Broa Reservoir) and its watershed, São Paulo, Brazil. **Freshwater Reviews**, v. 6, n. 2, p. 75–91, 2014.
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3005A: acid digestion of waters for total recoverable or dissolved metals for analysis by FLAA or ICP Spectroscopy**. US EPA - United States Environmental Protection Agency, 1992. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3005a.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2023.
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **New pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005**. Washington: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances: U.S. Environmental Protection Agency, 1996. 10 p.
- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **2,4-D**, 2014. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/24-d>>. Acesso em: 3 out. 2018.
- WICKHAM, H.; CHANG, W.; HENRY, L.; PEDERSEN, T. L.; TAKAHASHI, K.; WILKE, C.; WOO, K.; YUTANI, H.; DUNNINGTON, D.; RSTUDIO. **ggplot2: create elegant data visualisations using the grammar of graphics**, 2022a. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>>. Acesso em: 29 set. 2022.

WICKHAM, H.; HESTER, J.; CHANG, W.; BRYAN, J.; RSTUDIO. **devtools: tools to make developing R packages easier**, 2022b. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=devtools>>. Acesso em: 29 set. 2022.

YANG, X.; CHEN, S.; ZHANG, R. utilization of two invasive free-floating aquatic plants (*Pistia stratiotes* and *Eichhornia crassipes*) as sorbents for oil removal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 1, p. 781–786, 2014.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP: Rima, 2008. 472 p.

## **6 RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

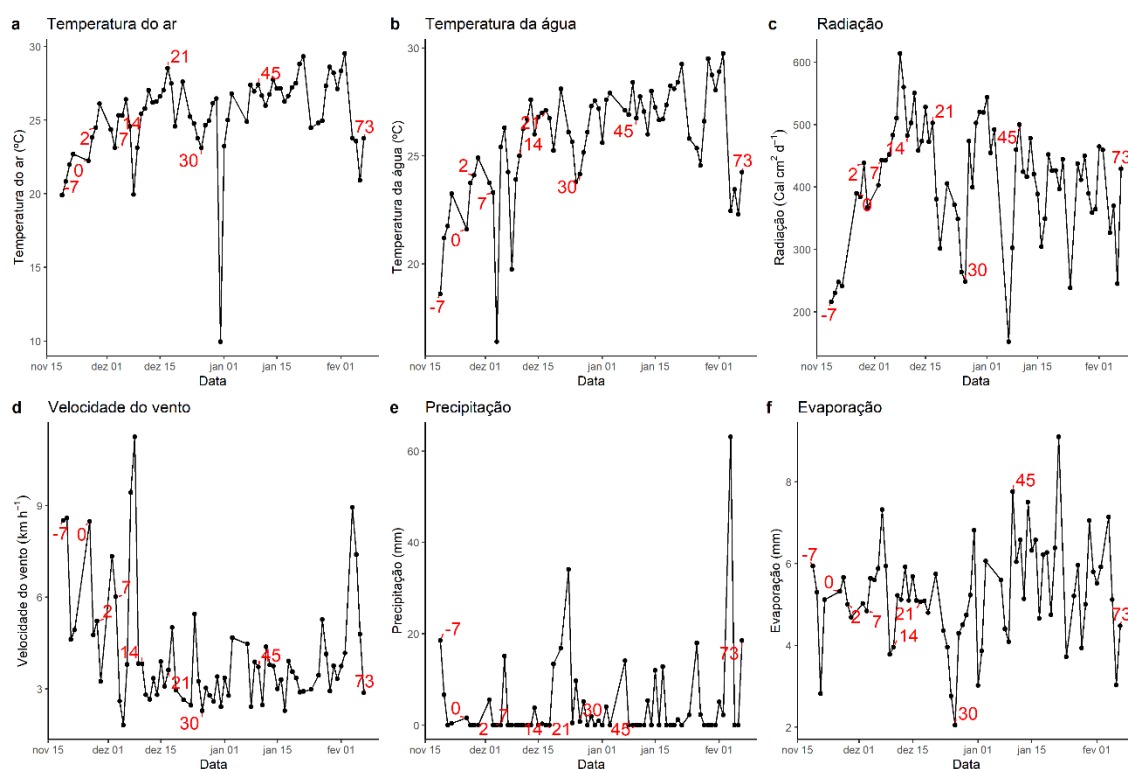


## **6.1 CAPÍTULO 1: IMPACTOS NA QUALIDADE DA ÁGUA DEVIDO AO USO DE AGROTÓXICOS EM CULTIVOS DE CANA-DE-AÇÚCAR: O QUE UM EXPERIMENTO EM MESOCOSMOS PODE RESPONDER**

Neste item optamos por apresentar os resultados e discussões de forma isolada, em função do volume de informação gerada. Assim, são apresentados os resultados das variáveis físicas, químicas (incluindo os metais e agrotóxicos) e biológicas (relacionadas com clorofila *a* e *b*), com menções as figuras, tabelas e apêndices/anexos. Posteriormente procurou-se discutir, mediante uma ampla análise estatística e referenciais teóricos, os resultados que foram obtidos. Por último, são apresentadas as principais conclusões desta etapa da pesquisa.

### **6.1.1 Variáveis climatológicas durante o período de estudo**

Em relação às variáveis climatológicas obtidas durante o período experimental, a temperatura do ar variou de 10,00 (no dia 35) a 29,50 °C (no dia 68) (Figura 7a); a temperatura da água variou de 16,4 (no dia 8) à 29,8 °C (no dia 68) (Figura 7b); a radiação variou de 152,47 (no dia 42) à 614,10 cal cm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (no dia 12) (Figura 7c); a velocidade do vento (em 2 m de altitude) variou de 1,81 (no dia 9) à 11,25 km h<sup>-1</sup> (no dia 12) (Figura 7d); a precipitação variou de 0 (no dia -5) à 63,10 mm (no dia 70) (Figura 7e); e a evaporação variou de 2,05 mm (no dia 31) à 9,10 mm (no dia 57) (Figura 7f).



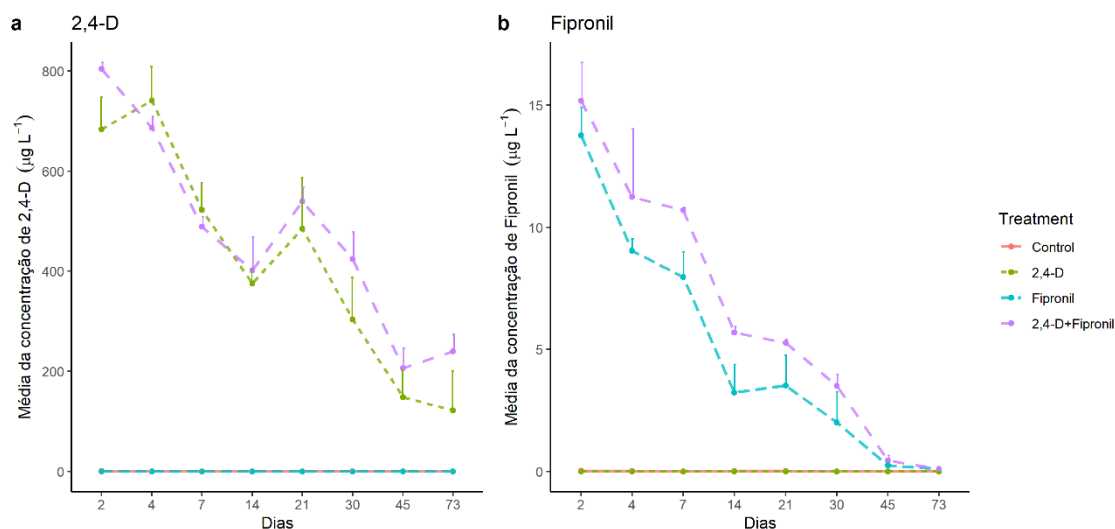
**Figura 7.** Valores dos parâmetros climatológicos da região do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA). **a)** Temperatura do ar; **b)** Temperatura da água; **c)** Radiação; **d)** Velocidade do vento em 2.00 m de altitude; **e)** Precipitação; e **f)** Evaporação. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0) e eles estão representados em pontos vermelhos sobre a linha do tempo.

### 6.1.2 Quantificação dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil nos mesocosmos

As médias e os desvios padrão dos resultados da quantificação química para as concentrações de 2,4-D ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 8a) nos mesocosmos para os dias 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle:**  $0,42 \pm 0,32$ ,  $0,15 \pm 0,14$ ,  $0,2 \pm 0,08$ ,  $0,13 \pm 0,04$ ,  $0,06 \pm 0,05$ ,  $0,15 \pm 0,15$ ,  $0,06 \pm 0,09$  e  $0,01 \pm 0,00$ ; **2,4-D:**  $683,72 \pm 63,45$ ,  $741,26 \pm 66,97$ ,  $522,53 \pm 54,44$ ,  $375,57 \pm 30,22$ ,  $484,86 \pm 102,39$ ,  $303,56 \pm 83,77$ ,  $148,48 \pm 53,73$  e  $122,14 \pm 78,86$ ; **Fipronil:**  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,06 \pm 0,05$ ,  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,03 \pm 0,01$ ; e **2,4-D+Fipronil:**  $804,04 \pm 13,21$ ,  $686,47 \pm 22,32$ ,  $488,74 \pm 20,25$ ,  $401,88 \pm 65,67$ ,  $539,73 \pm 27,60$ ,  $424,56 \pm 53,84$ ,  $206,80 \pm 39,73$  e  $239,55 \pm 34,68$ .

As médias e os desvios padrão dos resultados da quantificação química para as concentrações de Fipronil ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 8b) nos mesocosmos para os dias 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle:**  $0,03 \pm 0,01$ ,  $0,01 \pm 0,01$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,01 \pm 0,01$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; **2,4-D:**  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ,  $0,00 \pm 0,00$ ; **Fipronil:**  $13,77 \pm 1,14$ ,  $9,03$

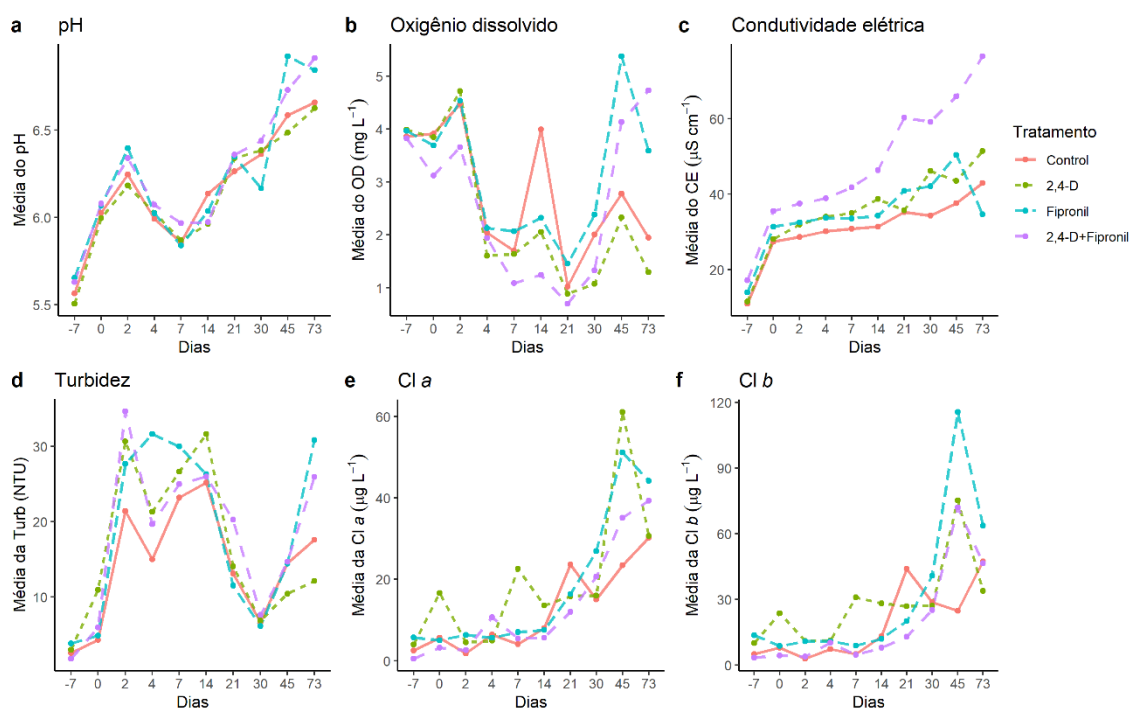
$\pm 0,50$ ,  $7,96 \pm 1,04$ ,  $3,23 \pm 1,14$ ,  $3,52 \pm 1,24$ ,  $2,00 \pm 1,25$ ,  $0,25 \pm 0,11$  e  $0,10 \pm 0,09$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $15,18 \pm 1,58$ ,  $11,25 \pm 2,77$ ,  $10,59 \pm 0,12$ ,  $5,69 \pm 0,26$ ,  $5,27 \pm 0,13$ ,  $3,50 \pm 0,47$ ,  $0,44 \pm 0,21$  e  $0,10 \pm 0,07$ .



**Figura 8.** Valores médios das concentrações dos agrotóxicos medidas em cada tratamento ao longo do tempo. **a)** 2,4-D; e **b)** Fipronil. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). As barras representam os valores médios “+” os desvios padrão. Treatment = tratamento e Control = tratamento controle.

### 6.1.3 Variáveis físicas, químicas e biológicas (clorofila *a* e feofitina)

Os resultados da média e do desvio padrão dos valores de potencial de hidrogênio - pH (Figura 9a) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle**:  $5,56 \pm 0,15$ ,  $6,03 \pm 0,28$ ,  $6,25 \pm 0,39$ ,  $5,99 \pm 0,15$ ,  $5,86 \pm 0,14$ ,  $6,14 \pm 0,69$ ,  $6,26 \pm 0,07$ ,  $6,39 \pm 0,11$ ,  $6,59 \pm 0,21$  e  $6,66 \pm 0,14$ ; **2,4-D**:  $5,51 \pm 0,17$ ,  $6,00 \pm 0,07$ ,  $6,18 \pm 0,22$ ,  $6,03 \pm 0,15$ ,  $5,87 \pm 0,21$ ,  $5,96 \pm 0,21$ ,  $6,34 \pm 0,09$ ,  $6,38 \pm 0,13$ ,  $6,49 \pm 0,03$  e  $6,63 \pm 0,05$ ; **Fipronil**:  $5,65 \pm 0,32$ ,  $6,07 \pm 0,25$ ,  $6,40 \pm 0,56$ ,  $6,02 \pm 0,26$ ,  $5,84 \pm 0,39$ ,  $6,04 \pm 0,30$ ,  $6,35 \pm 0,25$ ,  $6,17 \pm 0,12$ ,  $6,92 \pm 0,24$  e  $6,84 \pm 0,24$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $5,63 \pm 0,33$ ,  $6,08 \pm 0,18$ ,  $6,34 \pm 0,47$ ,  $6,07 \pm 0,26$ ,  $5,97 \pm 0,23$ ,  $5,97 \pm 0,30$ ,  $6,36 \pm 0,16$ ,  $6,44 \pm 0,13$ ,  $6,73 \pm 0,12$  e  $6,91 \pm 0,07$ .



**Figura 9.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos em cada tratamento ao longo do tempo. **a)** pH= potencial de hidrogênio; **b)** OD= Oxigênio dissolvido; **c)** CE= condutividade elétrica; **d)** Turb= turbidez; **e)** Cl a= clorofila a; e **f)** Cl b= clorofila b. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). As barras representam os valores médios “+” os desvios padrão. Control = tratamento controle.

Os resultados da média e do desvio padrão dos valores de oxigênio dissolvido - OD (mg L<sup>-1</sup>) (Figura 9b) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle:** 3,86 ±0,45, 3,91 ±1,26, 4,48 ±0,92, 2,04 ±0,66, 1,70 ±0,41, 4,00 ±2,50, 1,02 ±0,37, 2,01 ±1,20, 2,78 ±2,32 e 1,94 ±1,15; **2,4-D:** 3,99 ±0,86, 3,85 ±1,18, 4,72 ±1,60, 1,60 ±0,84, 1,64 ±0,70, 2,05 ±0,57, 0,88 ±0,36, 1,07 ±0,63, 2,33 ±3,21 e 1,29 ±0,50; **Fipronil:** 3,97 ±1,18, 3,69 ±1,74, 4,54 ±2,66, 2,13 ±1,57, 2,07 ±1,83, 2,32 ±1,85, 1,46 ±1,30, 2,38 ±1,64, 5,38 ±1,88 e 3,59 ±1,11; e **2,4-D+Fipronil:** 3,83 ±0,27, 3,12 ±0,88, 3,66 ±1,00, 1,94 ±1,05, 1,09 ±0,99, 1,24 ±0,66, 0,70 ±0,44, 1,33 ±0,76, 4,13 ±0,80 e 4,74 ±0,56.

Os resultados da média e do desvio padrão do condutividade elétrica - CE (μS cm<sup>-1</sup>) (Figura 9c) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle:** 10,98 ±1,85, 27,38 ±2,96, 28,66 ±3,01, 30,14 ±3,41, 30,82 ±3,85, 31,36 ±6,19, 35,22 ±4,89, 34,32 ±6,07, 37,62 ±9,34 e 42,98 ±9,74; **2,4-D:** 11,53 ±2,16, 28,10 ±5,21, 31,93 ±4,96, 34,00 ±6,07, 34,93 ±4,95, 38,73 ±5,45, 35,70 ±17,92, 46,13 ±5,82, 43,53 ±11,74, 51,47 ±11,58; **Fipronil:** 13,97 ±4,21, 31,33 ±4,96, 32,47 ±4,58, 3,77 ±4,91, 33,50 ±4,97, 34,33 ±6,95, 40,93 ±11,33, 42,13 ±17,32, 50,37 ±20,20 e 34,63 ±29,94; e **2,4-**

**D+Fipronil:** 17,19  $\pm$ 8,74, 35,5  $\pm$ 10,64, 37,5  $\pm$ 11,51, 38,9  $\pm$ 11,26, 41,83  $\pm$ 12,53, 46,37  $\pm$ 14,13, 60,33  $\pm$ 14,59, 59,15  $\pm$ 20,30, 65,97  $\pm$ 22,58 e 76,6  $\pm$ 20,45.

Os resultados da média e do desvio padrão dos valores de turbidez - Turb (NTU) (Apêndice Figura 9d) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle:** 2,57  $\pm$ 1,51, 4,29  $\pm$ 1,95, 21,40  $\pm$ 6,73, 15,00  $\pm$ 6,08, 23,20  $\pm$ 17,34, 25,20  $\pm$ 16,42, 13,10  $\pm$ 2,61, 6,65  $\pm$ 4,00, 14,50  $\pm$ 9,97 e 17,62  $\pm$ 8,85; **2,4-D:** 2,97  $\pm$ 0,95, 10,94  $\pm$ 7,50, 30,67  $\pm$ 13,05, 21,33  $\pm$ 12,42, 26,67  $\pm$ 13,65, 31,67  $\pm$ 18,01, 14,08  $\pm$ 8,27, 6,85  $\pm$ 5,70, 10,42  $\pm$ 3,42 e 12,14  $\pm$ 2,26; **Fipronil:** 3,85  $\pm$ 2,38, 4,87  $\pm$ 3,90, 27,67  $\pm$ 1,15, 31,67  $\pm$ 11,50, 30,00  $\pm$ 4,36, 26,33  $\pm$ 1,53, 11,52  $\pm$ 3,70, 6,16  $\pm$ 1,97, 14,43  $\pm$ 4,29 e 30,82  $\pm$ 5,05; e **2,4-D+Fipronil:** 1,83  $\pm$ 0,50, 5,96  $\pm$ 4,88, 34,67  $\pm$ 12,06, 19,67  $\pm$ 12,66, 25,00  $\pm$ 4,58, 26,00  $\pm$ 13,11, 20,27  $\pm$ 12,95, 7,60  $\pm$ 3,01, 14,67  $\pm$ 7,62 e 25,94  $\pm$ 12,36.

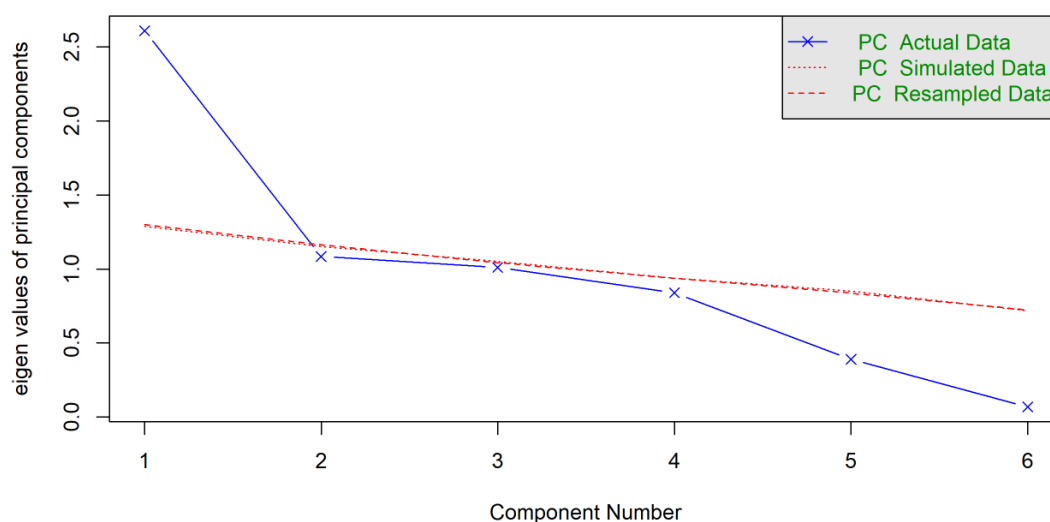
Os resultados da média e do desvio padrão da Clorofila *a* - Cla ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 9e) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle:** 2,50  $\pm$ 2,45, 5,65  $\pm$ 5,51, 1,78  $\pm$ 2,12, 6,48  $\pm$ 9,85, 4,10  $\pm$ 3,03, 8,02  $\pm$ 8,47, 23,62  $\pm$ 39,37, 15,03  $\pm$ 7,93, 23,43  $\pm$ 18,07 e 30,22  $\pm$ 44,50; **2,4-D:** 3,96  $\pm$ 3,55, 16,66  $\pm$ 9,16, 4,50  $\pm$ 5,42, 4,97  $\pm$ 4,99, 22,55  $\pm$ 24,34, 13,56  $\pm$ 11,23, 15,82  $\pm$ 10,96, 16,00  $\pm$ 7,02, 61,11  $\pm$ 22,69 e 30,68  $\pm$ 26,58; **Fipronil:** 5,71  $\pm$ 4,98, 5,07  $\pm$ 4,59, 6,33  $\pm$ 4,70, 5,63  $\pm$ 4,94, 7,03  $\pm$ 4,76, 7,57  $\pm$ 1,84, 16,40  $\pm$ 14,33, 26,89  $\pm$ 10,04, 51,17  $\pm$ 5,05 e 44,18  $\pm$ 3,00; e **2,4-D+Fipronil:** 0,54  $\pm$ 0,34, 3,23  $\pm$ 1,22, 2,63  $\pm$ 1,90, 10,71  $\pm$ 11,28, 5,49  $\pm$ 0,85, 5,63  $\pm$ 3,20, 12,05  $\pm$ 3,70, 20,65  $\pm$ 19,02, 35,13  $\pm$ 4,60 e 39,31  $\pm$ 16,93.

Os resultados da média e do desvio padrão dos valores de clorofila *b* - Clb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 9f) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle:** 4,97  $\pm$ 2,26, 7,94  $\pm$ 7,45, 2,95  $\pm$ 1,96, 7,27  $\pm$ 10,98, 5,02  $\pm$ 4,59, 13,13  $\pm$ 14,07, 43,95  $\pm$ 80,21, 28,60  $\pm$ 16,87, 24,74  $\pm$ 14,98 e 47,30  $\pm$ 76,04; **2,4-D:** 9,95  $\pm$ 7,69, 23,68  $\pm$ 13,40, 11,02  $\pm$ 11,48, 11,17  $\pm$ 10,82, 31,01  $\pm$ 29,17, 28,26  $\pm$ 24,68, 26,96  $\pm$ 22,83, 27,09  $\pm$ 18,11, 75,16  $\pm$ 39,15 e 33,94  $\pm$ 25,7; **Fipronil:** 13,61  $\pm$ 11,69, 8,75  $\pm$ 10,05, 10,82  $\pm$ 11,32, 10,83  $\pm$ 9,62, 8,94  $\pm$ 9,58, 12,04  $\pm$ 5,89, 20,16  $\pm$ 8,85, 40,88  $\pm$ 11,15, 115,63  $\pm$ 23,23 e 63,71  $\pm$ 18,16; e **2,4-D+Fipronil:** 3,33  $\pm$ 1,43, 4,30  $\pm$ 2,63, 3,90  $\pm$ 2,59, 10,11  $\pm$ 7,30, 4,61  $\pm$ 1,50, 7,98  $\pm$ 5,09, 12,90  $\pm$ 11,30, 25,13  $\pm$ 14,68, 72,00  $\pm$ 8,03 e 46,58  $\pm$ 14,83.

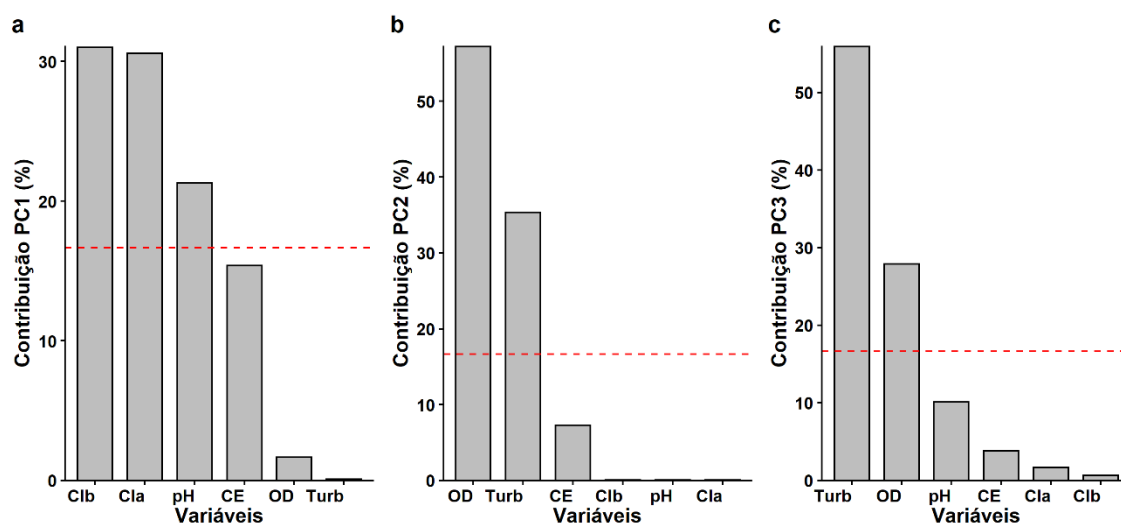
A análise *Parallel* (Figura 10) da PCA das variáveis limnológicas quantificadas *in situ* reteve apenas a PC1. A PC1 explica 43,50%, a PC2 18,10% e a PC3 explica 16,80% da variância dos dados originais. A soma da PC1, PC2 e PC3 explicam 78,40%

da variância dos dados originais. As variáveis que mais contribuíram para a PC1 (Figuras 11a e 12a) foram: pH (21,28%), Clb (31,01%) e Cla (30,59%) e elas estão relacionadas positivamente a PC1. As variáveis que mais contribuíram para a PC2 (Figura 11b e 12a) foram: OD (57,19%) e Turb (35,34%) e elas estão relacionadas positivamente a PC2. As variáveis que mais contribuíram para a PC3 foram OD (27,88%) e Turb (55,90%) e as mesmas estão relacionadas negativamente e positivamente a PC3, respectivamente (Figura 11c e 12b).

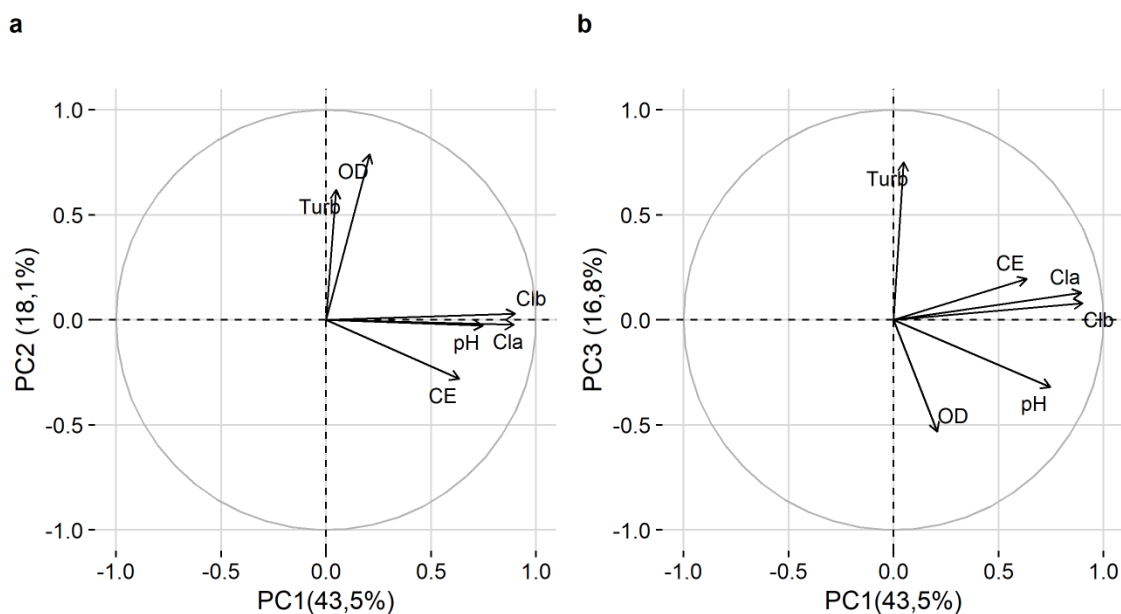
Na Figura 13 estão apresentados os padrões dos *scores* médios da PC1 (Figura 13a), da PC2 (Figura 13b) e da PC3 (Figura 13c) destas variáveis ao longo do tempo, agrupados por tratamentos. O apêndice A2 apresenta o padrão entre a PC1 *versus* PC2 (Figura A2a, A2c, A2e e A2g) e PC1 *versus* PC3 (Figura A2b, A2d, A2f e A2h) das variáveis medidas em campo em cada tratamento, representadas pelos mesocosmos ao longo do tempo.



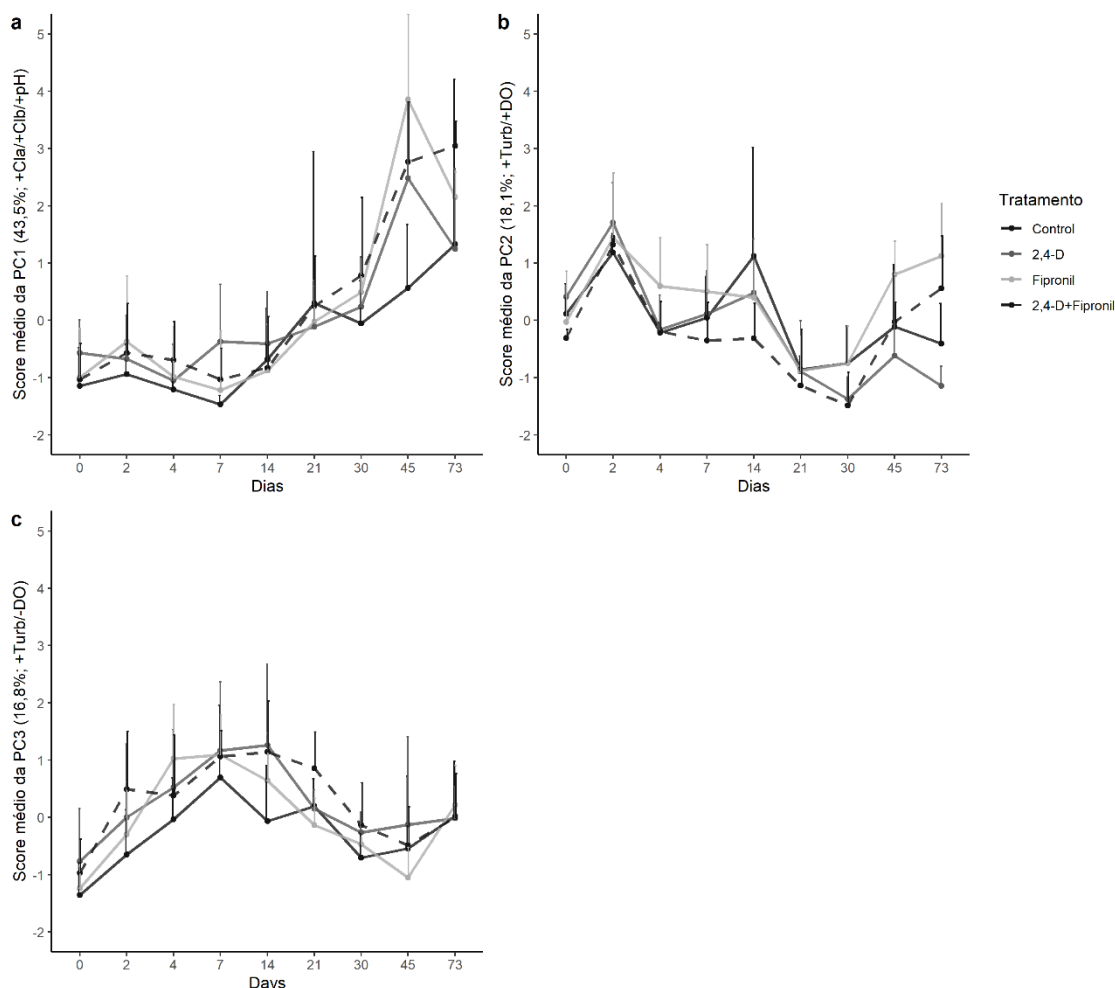
**Figura 10.** Análise *Parallel* da análise de componentes principais/ principal components analysis (PCA) das variáveis físicas e químicas nos mesocosmos durante o experimento. Component number= número de componentes; valores eigen das componentes principais; PC actual data= dados atuais da PC; PC simulated data = dados simulados das PC; e PC resampled data= dados reamostrados da PC.



**Figura 11.** Contribuição das variáveis (%) da análise de componentes principais/principal component analysis (PCA) para: **a)** componente principal/principal component (PC) 1; **b)** PC2; e **c)** PC3. Clb= clorofila b, Cla= clorofila a, pH= potencial de hidrogênio, CE= condutividade elétrica, OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez. As linhas pontilhadas vermelhas correspondem ao valor esperado caso a contribuição fosse uniforme. As contribuições acima da linha de referência podem ser consideradas como contribuições importantes para a PC.



**Figura 12.** Análise de componentes principais/principal component analysis (PCA) das variáveis físicas e químicas e suas componentes principais/ principal component (PC): **a)** PC1 versus PC2; e **b)** PC1 versus PC3. Clb= clorofila b, Cla= clorofila a, pH= potencial de hidrogênio, CE= condutividade elétrica, OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez. As flechas representam a magnitude e a direção da contribuição de cada uma das variáveis.



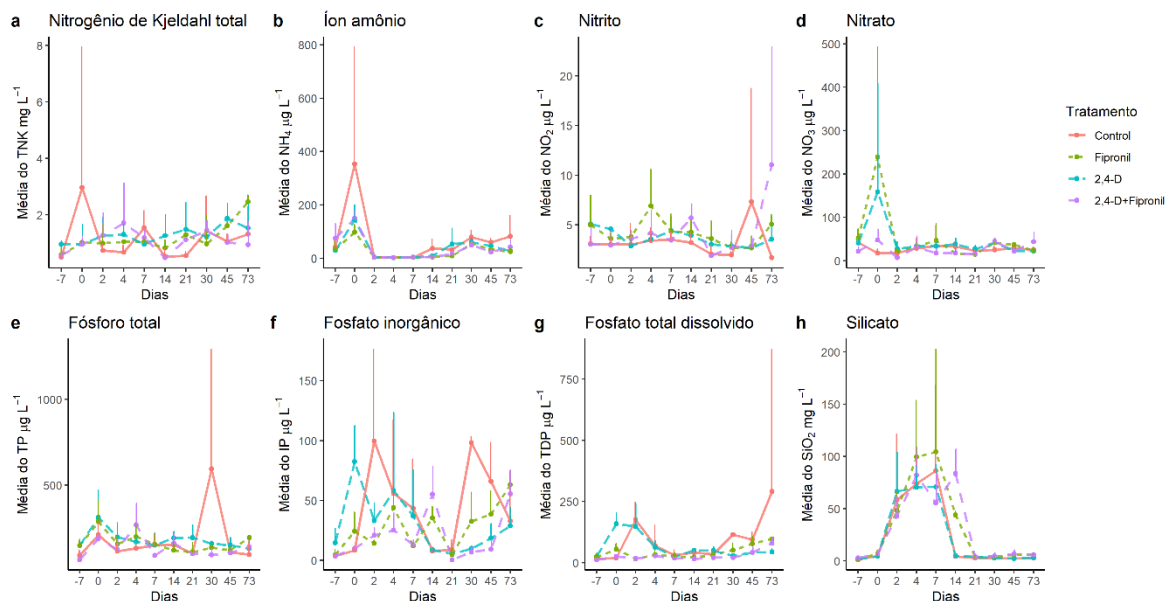
**Figura 13.** Scores médios das componentes principais/principal components (PC) das variáveis limnológicas medidas in situ, ao longo do tempo por tratamento. **a)** PC1 foi gerada por meio da contribuição das variáveis Clb= clorofila b, Cla= clorofila a e pH= potencial de hidrogênio; **b)** PC2 foi gerada por meio da contribuição das variáveis OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez; e **c)** PC3 foi gerada por meio da contribuição das variáveis OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). “+” significa que a PC se relaciona positivamente com a variável. “-” significa que a PC se relaciona negativamente com a variável. As barras representam os valores médios + os desvios padrão. Control = tratamento Controle.

#### 6.1.4 Quantificação dos nutrientes nitrogenados e fosfatados nos mesocosmos

Os resultados da média e do desvio padrão do nitrogênio total de Kjeldahl - NTK ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 14a) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle:**  $0,50 \pm 0,10$ ,  $2,96 \pm 4,97$ ,  $0,74 \pm 0,46$ ,  $0,67 \pm 0,26$ ,  $1,54 \pm 0,59$ ,  $0,51 \pm 0,44$ ,  $0,55 \pm 0,15$ ,  $1,43 \pm 1,23$ ,  $1,06 \pm 0,24$  e  $1,31 \pm 0,97$ ; **2,4-D:**  $0,96 \pm 0,12$ ,  $0,95 \pm 0,71$ ,  $1,27 \pm 0,66$ ,  $1,31 \pm 0,48$ ,  $0,96 \pm 0,14$ ,  $1,26 \pm 0,75$ ,  $1,48 \pm 0,96$ ,  $1,21 \pm 0,36$ ,  $1,87 \pm 0,53$  e  $1,52 \pm 0,83$ ; **Fipronil:**  $0,59 \pm 0,27$ ,  $1,01 \pm 0,10$ ,  $0,99 \pm 0,67$ ,  $1,04 \pm 0,07$ ,  $1,04 \pm 0,18$ ,  $0,82 \pm 0,29$ ,  $1,29 \pm 0,26$ ,  $0,97 \pm 1,01$ ,  $1,62 \pm 0,13$  e  $2,46 \pm 0,23$ ; e **2,4-D+Fipronil:**  $0,56 \pm 0,09$ ,  $0,96$



$\pm 0,28$ ,  $1,26 \pm 0,79$ ,  $1,71 \pm 1,41$ ,  $1,18 \pm 0,28$ ,  $0,48 \pm 0,12$ ,  $1,12 \pm 0,00$ ,  $1,44 \pm 0,35$ ,  $1,03 \pm 0,28$  e  $0,93 \pm 0,81$ .



**Figura 14.** Valores médios dos nutrientes em cada tratamento ao longo do tempo. **a)** Nitrogênio total de Kjeldahl; **b)** íon amônio; **c)** Nitrito; **d)** Nitrato; **e)** Fósforo total; **f)** Fosfato inorgânico; **g)** Fosfato total dissolvido; e **h)** Silicato reativo. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). As barras representam os valores médios “+” os desvios padrão. Control = tratamento controle.

Os resultados da média e do desvio padrão do íon amônio -  $\text{NH}_4$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 14b) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle:**  $40,99 \pm 27,48$ ,  $352,58 \pm 438,86$ ,  $3,09 \pm 0,25$ ,  $2,64 \pm 0,77$ ,  $2,56 \pm 0,60$ ,  $36,83 \pm 34,91$ ,  $32,29 \pm 3,05$ ,  $78,95 \pm 26,33$ ,  $59,29 \pm 13,76$  e  $82,68 \pm 77,48$ ; **2,4-D:**  $28,67 \pm 6,23$ ,  $144,36 \pm 55,23$ ,  $4,15 \pm 1,22$ ,  $2,38 \pm 0,42$ ,  $3,29 \pm 1,05$ ,  $8,81 \pm 2,33$ ,  $52,42 \pm 59,65$ ,  $60,64 \pm 13,60$ ,  $46,54 \pm 7,39$  e  $27,54 \pm 15,68$ ; **Fipronil:**  $33,42 \pm 30,24$ ,  $97,32 \pm 29,08$ ,  $4,45 \pm 3,95$ ,  $3,13 \pm 0,91$ ,  $3,36 \pm 0,87$ ,  $4,65 \pm 3,88$ ,  $8,52 \pm 3,68$ ,  $55,13 \pm 9,63$ ,  $32,36 \pm 5,99$  e  $24,43 \pm 12,15$ ; e **2,4-D+Fipronil:**  $74,47 \pm 55,79$ ,  $150,80 \pm 28,41$ ,  $3,74 \pm 2,36$ ,  $2,64 \pm 1,20$ ,  $4,49 \pm 2,86$ ,  $4,86 \pm 3,29$ ,  $15,87 \pm 0,00$ ,  $49,47 \pm 14,25$ ,  $23,14 \pm 14,90$  e  $41,90 \pm 27,59$ .

Os resultados da média e do desvio padrão dos valores de nitrito -  $\text{NO}_2$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 14c) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle:**  $3,09 \pm 0,72$ ,  $3,03 \pm 1,03$ ,  $3,01 \pm 2,11$ ,  $3,43 \pm 1,25$ ,  $3,50 \pm 1,38$ ,  $3,19 \pm 0,97$ ,  $2,06 \pm 0,87$ ,  $1,97 \pm 0,35$ ,  $7,31 \pm 11,42$  e  $1,70 \pm 0,42$ ; **2,4-D:**  $5,09 \pm 2,87$ ,  $4,57 \pm 0,10$ ,  $2,85 \pm 1,36$ ,  $3,55 \pm 0,86$ ,  $4,39 \pm 1,41$ ,  $3,95 \pm 1,47$ ,  $3,01 \pm 1,18$ ,  $2,87 \pm 1,14$ ,  $2,65 \pm 0,70$  e  $3,54 \pm 2,29$ ; **Fipronil:**  $4,96 \pm 2,99$ ,  $3,61 \pm 0,61$ ,  $3,79 \pm 0,15$ ,  $6,88 \pm 3,73$ ,  $4,32 \pm 1,77$ ,  $4,25 \pm 1,12$ ,  $3,60$

$\pm 1,81$ ,  $2,71 \pm 0,53$ ,  $2,67 \pm 1,15$  e  $5,07 \pm 0,95$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $3,06 \pm 1,73$ ,  $2,93 \pm 1,49$ ,  $3,59 \pm 0,84$ ,  $4,14 \pm 2,28$ ,  $3,44 \pm 0,71$ ,  $5,69 \pm 1,41$ ,  $1,90 \pm 0,00$ ,  $2,73 \pm 1,65$ ,  $2,85 \pm 1,02$  e  $11,04 \pm 11,84$ .

Os resultados da média e do desvio padrão dos valores de nitrato -  $\text{NO}_3$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 14d) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle**:  $41,88 \pm 11,41$ ,  $17,38 \pm 9,98$ ,  $18,10 \pm 20,69$ ,  $28,48 \pm 23,29$ ,  $34,36 \pm 46,61$ ,  $32,94 \pm 1,83$ ,  $23,08 \pm 4,91$ ,  $25,37 \pm 8,85$ ,  $29,61 \pm 9,94$  e  $24,79 \pm 4,01$ ; **2,4-D**:  $40,80 \pm 10,26$ ,  $158,75 \pm 249,92$ ,  $27,30 \pm 16,41$ ,  $33,81 \pm 13,95$ ,  $33,72 \pm 21,59$ ,  $38,50 \pm 12,12$ ,  $27,33 \pm 7,56$ ,  $41,98 \pm 8,75$ ,  $22,77 \pm 3,21$  e  $22,50 \pm 2,63$ ; **Fipronil**:  $51,96 \pm 21,79$ ,  $238,85 \pm 253,26$ ,  $21,74 \pm 5,59$ ,  $32,92 \pm 8,88$ ,  $46,39 \pm 39,31$ ,  $17,13 \pm 9,16$ ,  $14,38 \pm 1,72$ ,  $41,56 \pm 7,28$ ,  $37,06 \pm 1,44$  e  $23,62 \pm 7,28$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $21,71 \pm 10,16$ ,  $47,86 \pm 24,83$ ,  $7,32 \pm 2,16$ ,  $31,62 \pm 24,86$ ,  $17,45 \pm 10,49$ ,  $17,56 \pm 6,83$ ,  $15,06 \pm 0,00$ ,  $44,79 \pm 7,53$ ,  $22,11 \pm 4,15$  e  $44,04 \pm 21,74$ .

Os resultados da média e do desvio padrão dos valores de fósforo total - PT ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 14e) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle**:  $90,05 \pm 32,47$ ,  $209,66 \pm 122,00$ ,  $115,19 \pm 76,11$ ,  $132,32 \pm 52,89$ ,  $150,74 \pm 68,22$ ,  $151,14 \pm 40,03$ ,  $102,25 \pm 28,15$ ,  $594,63 \pm 698,15$ ,  $109,36 \pm 29,34$  e  $96,30 \pm 75,85$ ; **2,4-D**:  $148,11 \pm 36,13$ ,  $311,36 \pm 160,87$ ,  $197,62 \pm 82,04$ ,  $169,50 \pm 40,73$ ,  $150,98 \pm 71,11$ ,  $193,15 \pm 36,38$ ,  $194,42 \pm 73,52$ ,  $158,32 \pm 14,34$ ,  $149,64 \pm 45,12$  e  $130,64 \pm 58,13$ ; **Fipronil**:  $148,78 \pm 31,71$ ,  $286,92 \pm 126,48$ ,  $157,90 \pm 44,88$ ,  $200,13 \pm 81,25$ ,  $154,64 \pm 61,59$ ,  $120,13 \pm 46,84$ ,  $109,42 \pm 56,85$ ,  $135,90 \pm 23,08$ ,  $122,57 \pm 22,57$  e  $193,49 \pm 10,04$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $66,40 \pm 50,93$ ,  $189,63 \pm 20,54$ ,  $125,25 \pm 62,72$ ,  $268,91 \pm 124,29$ ,  $90,09 \pm 11,72$ ,  $162,65 \pm 52,27$ ,  $99,92 \pm 0,00$ ,  $93,83 \pm 35,53$ ,  $106,68 \pm 22,28$  e  $138,73 \pm 17,51$ .

Os resultados da média e do desvio padrão dos valores de fosfato inorgânico - PI ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 14f) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle**:  $3,48 \pm 2,11$ ,  $8,34 \pm 3,54$ ,  $99,68 \pm 76,71$ ,  $56,09 \pm 60,94$ ,  $43,31 \pm 41,33$ ,  $7,72 \pm 3,66$ ,  $8,83 \pm 8,41$ ,  $98,05 \pm 4,88$ ,  $65,73 \pm 32,54$  e  $32,78 \pm 42,24$ ; **2,4-D**:  $14,57 \pm 11,89$ ,  $82,62 \pm 29,84$ ,  $32,98 \pm 14,85$ ,  $58,36 \pm 64,91$ ,  $37,18 \pm 38,05$ ,  $8,86 \pm 1,22$ ,  $5,38 \pm 2,91$ ,  $9,90 \pm 2,12$ ,  $18,29 \pm 12,16$  e  $28,81 \pm 15,07$ ; **Fipronil**:  $4,66 \pm 4,53$ ,  $24,19 \pm 16,20$ ,  $14,14 \pm 2,54$ ,  $43,91 \pm 31,77$ ,  $12,22 \pm 2,56$ ,  $35,24 \pm 9,61$ ,  $4,77 \pm 5,57$ ,  $32,60 \pm 24,28$ ,  $38,66 \pm 19,27$  e  $63,18 \pm 8,98$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $3,67 \pm 2,25$ ,  $9,94 \pm 1,48$ ,  $20,93 \pm 6,11$ ,  $25,10 \pm 14,51$ ,  $13,21 \pm 3,96$ ,  $55,21 \pm 22,97$ ,  $0,61 \pm 0,00$ ,  $6,72 \pm 4,34$ ,  $9,27 \pm 7,54$  e  $55,58 \pm 19,65$ .

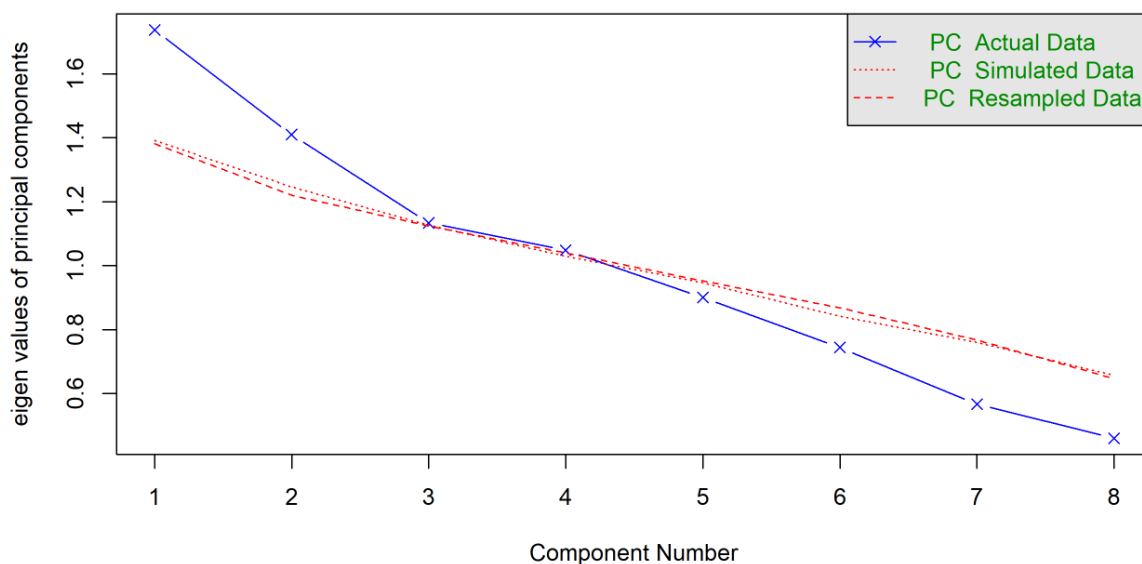
Os resultados da média e do desvio padrão dos valores de fosfato total dissolvido - PTD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 14g) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle**: 15,56  $\pm$ 3,54, 20,13  $\pm$ 3,24, 175,93  $\pm$ 71,44, 69,30  $\pm$ 84,44, 31,12  $\pm$ 21,37, 41,77  $\pm$ 12,01, 34,45  $\pm$ 19,81, 115,22  $\pm$ 3,72, 95,26  $\pm$ 30,97 e 290,94  $\pm$ 581,04; **2,4-D**: 26,14  $\pm$ 14,88, 158,99  $\pm$ 43,82, 147,89  $\pm$ 93,94, 63,31  $\pm$ 27,45, 24,55  $\pm$ 3,62, 51,01  $\pm$ 3,07, 49,60  $\pm$ 16,36, 29,10  $\pm$ 3,98; 42,73  $\pm$ 13,74 e 45,09  $\pm$ 12,98; **Fipronil**: 22,12  $\pm$ 12,94, 56,25  $\pm$ 21,67, 16,18  $\pm$ 0,30, 32,33  $\pm$ 20,19, 25,46  $\pm$ 14,48, 21,87  $\pm$ 12,11, 31,98  $\pm$ 11,71, 52,43  $\pm$ 28,22, 78,17  $\pm$ 28,96 e 97,68  $\pm$ 7,87; e **2,4-D+Fipronil**: 13,14  $\pm$ 7,74, 25,55  $\pm$ 8,22, 17,50  $\pm$ 2,24, 28,59  $\pm$  5,13, 18,16  $\pm$ 3,08, 16,75  $\pm$ 8,22, 20,66  $\pm$ 0,00, 21,03  $\pm$ 9,89, 42,63  $\pm$ 20,97 e 80,12  $\pm$ 20,82.

Os resultados da média e do desvio padrão dos valores de silicato reativo -  $\text{SiO}_2$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 14h) nos mesocosmos para os dias -7, 0, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 foram: **Controle**: 1,19  $\pm$ 0,71, 4,94  $\pm$ 2,72, 58,21  $\pm$ 62,78, 73,89  $\pm$ 55,95, 86,39  $\pm$ 82,26, 4,24  $\pm$ 1,70, 2,91  $\pm$ 0,63, 2,61  $\pm$ 1,10, 2,15  $\pm$ 0,53 e 2,59  $\pm$ 0,58; **2,4-D**: 1,53  $\pm$ 0,27, 4,43  $\pm$ 1,84, 66,36  $\pm$ 37,58, 70,34  $\pm$ 21,08, 70,60  $\pm$ 21,28, 4,82  $\pm$ 0,39, 3,87  $\pm$ 0,62, 2,73  $\pm$ 0,43, 2,13  $\pm$ 0,78 e 2,98  $\pm$ 0,29; **Fipronil**: 1,90  $\pm$ 1,47, 6,61  $\pm$ 3,72, 48,14  $\pm$ 18,05, 99,26  $\pm$ 54,25, 104,39  $\pm$ 98,16, 43,71  $\pm$ 3,79, 3,62  $\pm$ 1,17, 3,97  $\pm$ 2,38, 6,05  $\pm$ 2,87 e 5,74  $\pm$ 1,77; e **2,4-D+Fipronil**: 2,76  $\pm$ 1,86, 6,72  $\pm$ 3,13, 42,96  $\pm$ 18,34, 81,95  $\pm$ 26,98, 55,47  $\pm$ 27,04, 83,40  $\pm$ 23,58, 3,99  $\pm$ 0,00, 4,59  $\pm$ 3,02, 6,42  $\pm$ 3,82 e 5,64  $\pm$ 2,06.

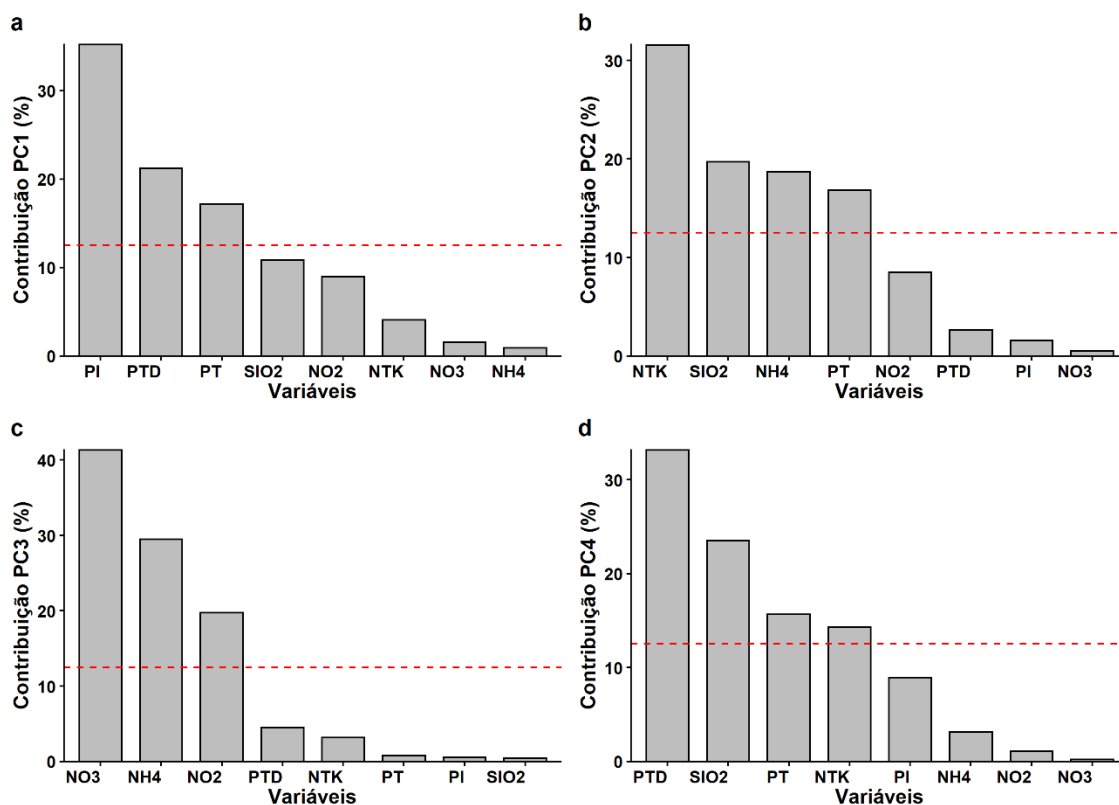
A análise *Parallel* (Figura 15) da PCA das variáveis dos nutrientes reteve a PC1, a PC2, a PC3 e a PC4. A PC1 explicou 21,70%, a PC2 17,60%, a PC3 14,20% e a PC4 13,10% da variância dos dados originais. A soma das PC1, PC2, PC3 e PC4 explicou 76,60% da variância dos dados originais. As variáveis que mais contribuíram para a PC1 (Figura 16a e 17a) foram o PI (35,20%), o PTD (21,22%) e o PT (17,18%), os quais estão relacionados positivamente com a PC1. As variáveis que mais contribuíram para a PC2 (Figura 16b e 17a) foram o NTK (31,59%), o  $\text{SiO}_2$  (19,72%), o  $\text{NH}_4$  (18,69%) e o PT (16,83%), sendo que os mesmos estão relacionados positivamente, negativamente, positivamente e positivamente com a PC2, respectivamente. As variáveis que mais contribuíram para a PC3 foram o  $\text{NO}_3$  (41,30%), o  $\text{NH}_4$  (29,45%) e o  $\text{NO}_2$  (19,73%), os quais estão relacionados positivamente com a PC3 (Figura 16c e 17b). As variáveis que mais contribuíram para a PC4 foram o PTD (33,14%), o  $\text{SiO}_2$  (23,55%), o PT (15,67%)

e o NTK (14,28%), os quais estão relacionados negativamente, positivamente, positivamente e positivamente com a PC4, respectivamente (Figura 16d e 17c).

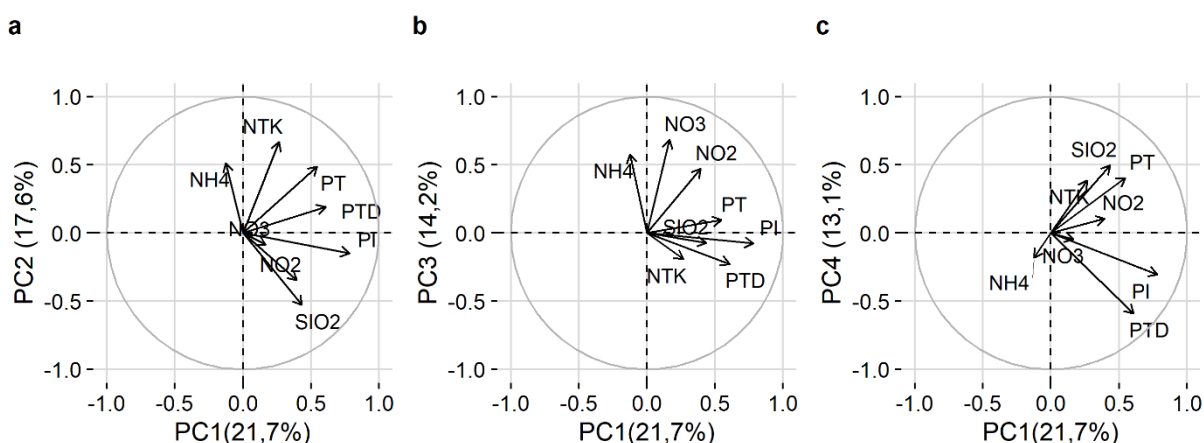
A Figura 17 traz os padrões dos *scores* médios da PC1 (Figura 18a), da PC2 (Figura 18b), da PC3 (Figura 18c) e da PC4 (Figura 18d) das variáveis nutrientes ao longo do tempo e agrupadas em tratamentos. O Apêndice A3 mostra os padrões da PC1 *versus* PC2 (Apêndice A3a, A3d, A3g e A3j), PC1 *versus* PC3 (Apêndice A3b, A3e, A3h e A3k) e PC1 *versus* PC4 (Apêndice A3c, A3f, A3i e A3l) das variáveis nutrientes em cada tratamento, representada por mesocosmos ao longo do tempo.



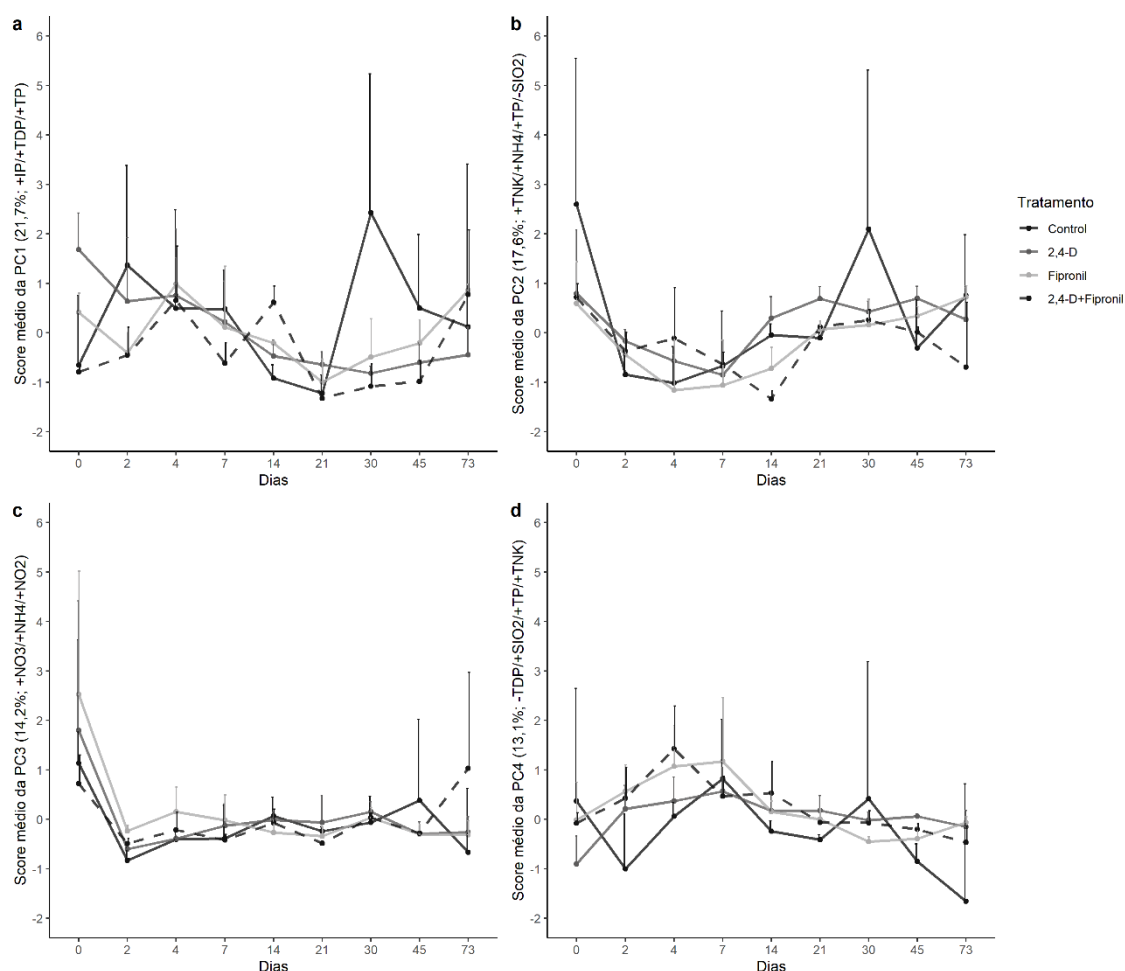
**Figura 15.** Análise *Parallel* da análise de componentes principais/ *principal components analysis* (PCA) dos nutrientes nos mesocosmos durante o experimento. Component number= número de componentes; valores eigen das componentes principais; PC actual data= dados atuais da PC; PC simulated data = dados simulados das PC; e PC resampled data= dados reamostrados da PC.



**Figura 16.** Contribuição das variáveis (%) da análise de componentes principais/principal component analysis (PCA) para: **a)** componente principal/principal component (PC) 1; **b)** PC2; **c)** PC3; e **d)** PC4. NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, PT= fósforo total, NO<sub>2</sub>= nitrito, PI= fosfato inorgânico, PTD= fosfato total dissolvido, NO<sub>3</sub>= nitrato, SIO<sub>2</sub>= silicato reativo e NH<sub>4</sub>= íon amônio. As linhas pontilhadas vermelhas correspondem ao valor esperado caso a contribuição fosse uniforme. As contribuições acima da linha de referência podem ser consideradas como contribuições importantes para a PC.



**Figura 17.** Análise de componentes principais/principal component analysis (PCA) dos nutrientes e suas componentes principais/principal component (PC): **a)** PC1 versus PC2; **b)** PC1 versus PC3; e **c)** PC1 versus PC4. NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, PT= fósforo total, NO<sub>2</sub>= nitrito, PI= fosfato inorgânico, PTD= fosfato total dissolvido, NO<sub>3</sub>= nitrato, SIO<sub>2</sub>= silicato reativo e NH<sub>4</sub>= íon amônio. As flechas representam a magnitude e a direção da contribuição de cada uma das variáveis.



**Figura 18.** Scores médios das componentes principais/*principal components* (PC) dos nutrientes ao longo do tempo por tratamento. **a)** PC1 foi gerada por meio da contribuição das variáveis PI= fósforo inorgânico, PTD= fósforo total dissolvido e PT= fósforo total. **b)** PC2 foi gerada por meio da contribuição das variáveis NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, NH<sub>4</sub>= íon amônio, PT e SiO<sub>2</sub>= silicato reativo. **c)** PC3 foi gerada pela contribuição das variáveis NO<sub>2</sub>= nitrito, NO<sub>3</sub>= nitrato e NH<sub>4</sub>. E **d)** PC4 foi gerada pela contribuição das variáveis PTD, SiO<sub>2</sub>, PT e NTK. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). “+” significa que a PC se relaciona positivamente com a variável. “-” significa que a PC se relaciona negativamente com a variável. As barras representam os valores médios + os desvios padrão. Control = tratamento Controle.

### 6.1.5 Quantificação dos metais nos mesocosmos

Os resultados da média e do desvio padrão do Al (mg L<sup>-1</sup>) (Figura 19a) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle:** 1,57 ±0,86 e 1,57 ±0,73; **2,4-D:** 5,18 ±1,60 e 5,00 ±2,88; **Fipronil:** 5,10 ±2,71 e 5,27 ±3,77; e **2,4-D+Fipronil:** 2,84 ±1,87 e 3,84 ±1,08.

Os resultados da média e do desvio padrão do Ba (mg L<sup>-1</sup>) (Figura 19b) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle:** 0,02 ±0,01 e 0,01 ±0,00; **2,4-D:** 0,04

$\pm 0,02$  e  $0,02 \pm 0,00$ ; **Fipronil**:  $0,01 \pm 0,01$  e  $0,02 \pm 0,02$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,03 \pm 0,02$  e  $0,03 \pm 0,01$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do Cd ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19c) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; **2,4-D**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; **Fipronil**:  $0,07 \pm 0,12$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do Co ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19d) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; **2,4-D**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; **Fipronil**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,01 \pm 0,02$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,04 \pm 0,01$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do Cr ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19e) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $0,01 \pm 0,00$  e  $0,01 \pm 0,00$ ; **2,4-D**:  $0,01 \pm 0,00$  e  $0,01 \pm 0,00$ ; **Fipronil**:  $0,02 \pm 0,03$  e  $0,01 \pm 0,00$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,01 \pm 0,00$  e  $0,01 \pm 0,00$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do Cu ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19f) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $0,03 \pm 0,01$  e  $0,02 \pm 0,00$ ; **2,4-D**:  $0,03 \pm 0,01$  e  $0,05 \pm 0,01$ ; **Fipronil**:  $0,03 \pm 0,00$  e  $0,04 \pm 0,01$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,03 \pm 0,00$  e  $0,04 \pm 0,00$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do K ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19g) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $3.775,60 \pm 610,06$  e  $3.684,60 \pm 650,18$ ; **2,4-D**:  $4.922,67 \pm 858,51$  e  $4.877,50 \pm 398,10$ ; **Fipronil**:  $4.813,33 \pm 1.049,10$  e  $5.053,67 \pm 1.172,72$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $5.675,00 \pm 6.34,16$  e  $5.358,00 \pm 1.398,61$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do Mn ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19h) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $0,11 \pm 0,09$  e  $0,09 \pm 0,03$ ; **2,4-D**:  $0,36 \pm 0,05$  e  $0,26 \pm 0,22$ ; **Fipronil**:  $0,16 \pm 0,17$  e  $0,22 \pm 0,20$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,23 \pm 0,14$  e  $0,29 \pm 0,11$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do Mo ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19i) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; **2,4-D**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; **Fipronil**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,00 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do Ni ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19j) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $0,01 \pm 0,00$  e  $0,01 \pm 0,00$ ; **2,4-D**:  $0,01$

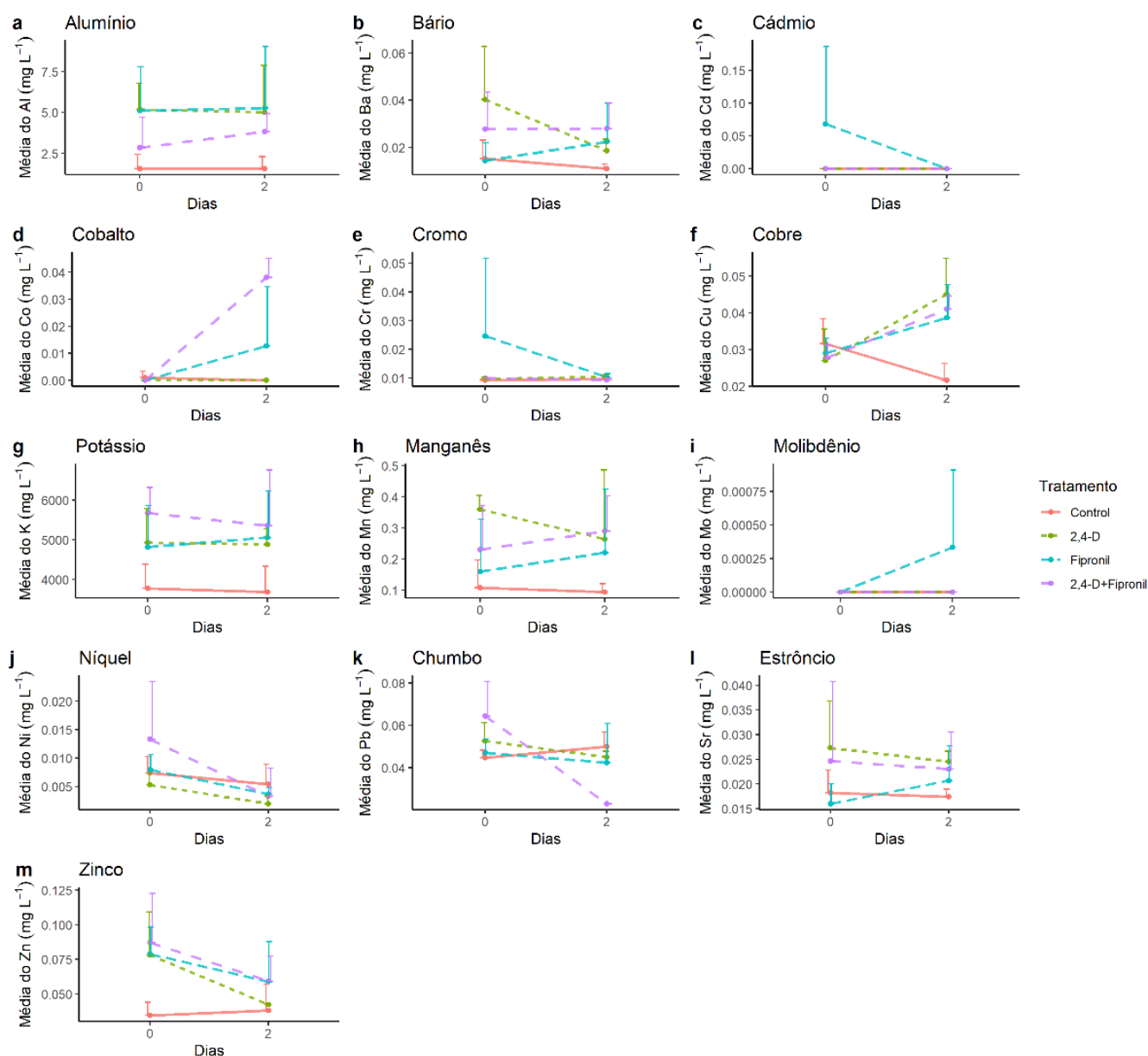
$\pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; **Fipronil**:  $0,01 \pm 0,00$  e  $0,00 \pm 0,00$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,01 \pm 0,01$  e  $0,00 \pm 0,00$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do Pb ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19k) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $0,04 \pm 0,00$  e  $0,05 \pm 0,01$ ; **2,4-D**:  $0,05 \pm 0,01$  e  $0,05 \pm 0,00$ ; **Fipronil**:  $0,05 \pm 0,01$  e  $0,04 \pm 0,02$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,06 \pm 0,02$  e  $0,02 \pm 0,00$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do Sr ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19l) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $0,02 \pm 0,00$  e  $0,02 \pm 0,00$ ; **2,4-D**:  $0,03 \pm 0,01$  e  $0,02 \pm 0,00$ ; **Fipronil**:  $0,02 \pm 0,01$  e  $0,02 \pm 0,01$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,02 \pm 0,02$  e  $0,02 \pm 0,01$ .

Os resultados da média e do desvio padrão do Zn ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 19m) nos mesocosmos para os dias 0 e 2 foram: **Controle**:  $0,03 \pm 0,01$  e  $0,04 \pm 0,02$ ; **2,4-D**:  $0,08 \pm 0,03$  e  $0,04 \pm 0,00$ ; **Fipronil**:  $0,08 \pm 0,02$  e  $0,06 \pm 0,03$ ; e **2,4-D+Fipronil**:  $0,09 \pm 0,04$  e  $0,06 \pm 0,02$ .



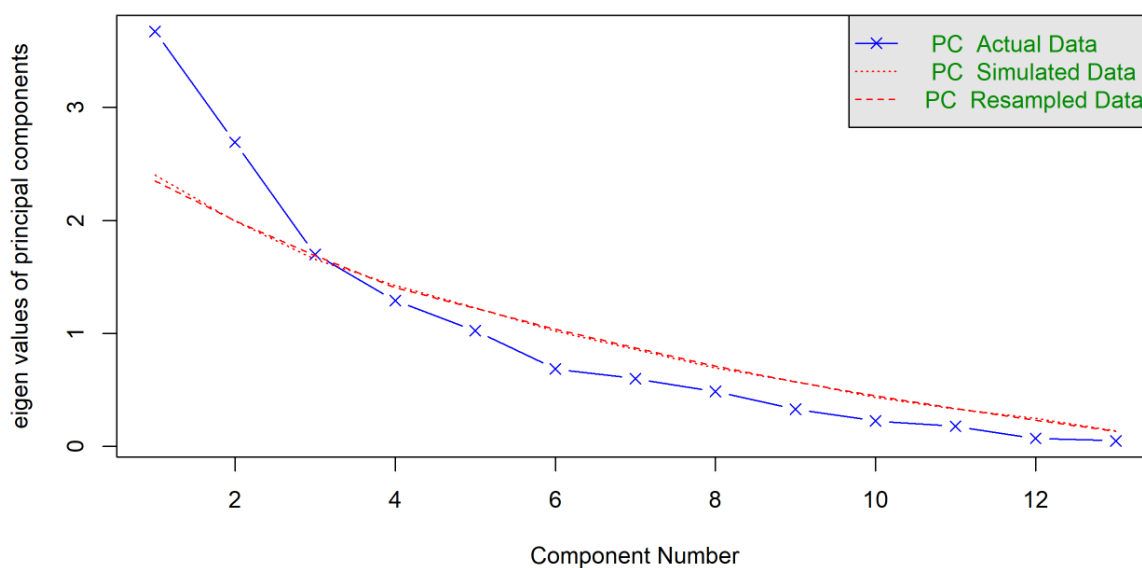


**Figura 19.** Valores médios dos metais em cada tratamento ao longo do tempo. a) Alumínio; b) Bário; c) Cádmi; d) Cobalto; e) Cromo; f) Cobre; g) Potássio; h) Manganês; i) Molibdênio; j) Níquel; k) Chumbo; l) Estrôncio; e m) Zinco. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). As barras representam os valores médios “+” os desvios padrão. Control = tratamento controle.

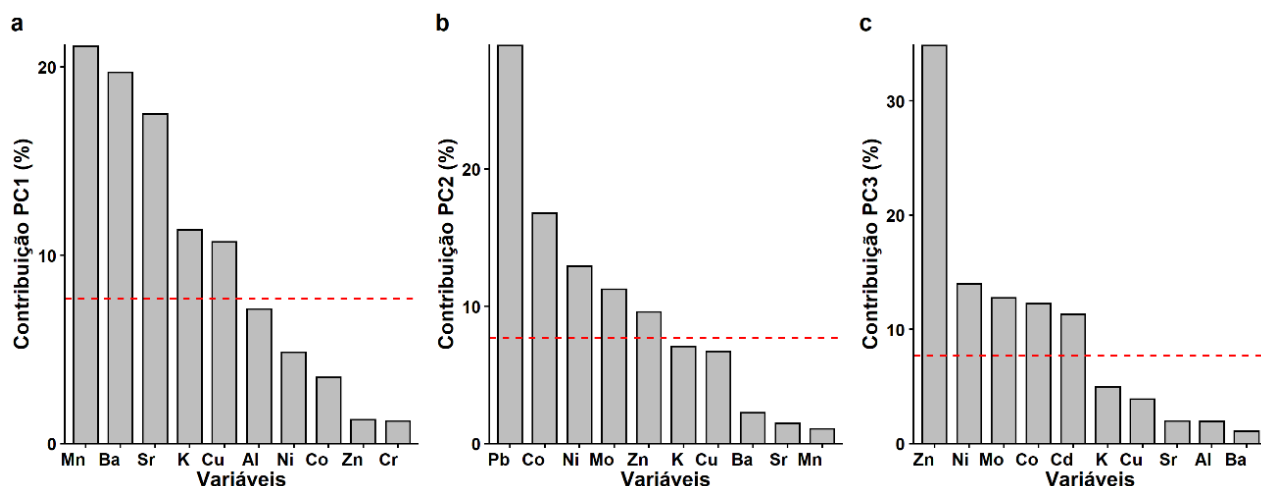
A análise *Parallel* (Figura 20) da PCA das variáveis metais reteve a PC1, PC2 e PC3. A PC1 explicou 28,20%, a PC2 20,70% e a PC3 13,10% da variância dos dados originais. A soma das PC1, PC2 e PC3 explicou 62,00% da variância dos dados originais. As variáveis que mais contribuíram com a PC1 (Figura 21a e 22a) foram o Mn (21,09%), o Ba (19,71%), o Sr (17,50%), o K (11,33%) e o Cu (10,70%), os mesmos estão relacionados positivamente com a PC1, respectivamente. As variáveis que mais contribuíram para a PC2 (Figura 21b e 22a) foram o Pb (28,96%), o Co (16,79%), o Ni

(12,90%), o Mo (11,23%) e o Zn (9,60%), os quais estão relacionados positivamente, negativamente, positivamente, negativamente e positivamente a PC2, respectivamente. As variáveis que mais contribuíram para a PC3 (Figura 21c e 22b) foram o Zn (34,84%), o Ni (13,96%), Mo (12,76%), o Co (12,23%) e o Cd (11,29%), estes estão relacionados positivamente com a PC3.

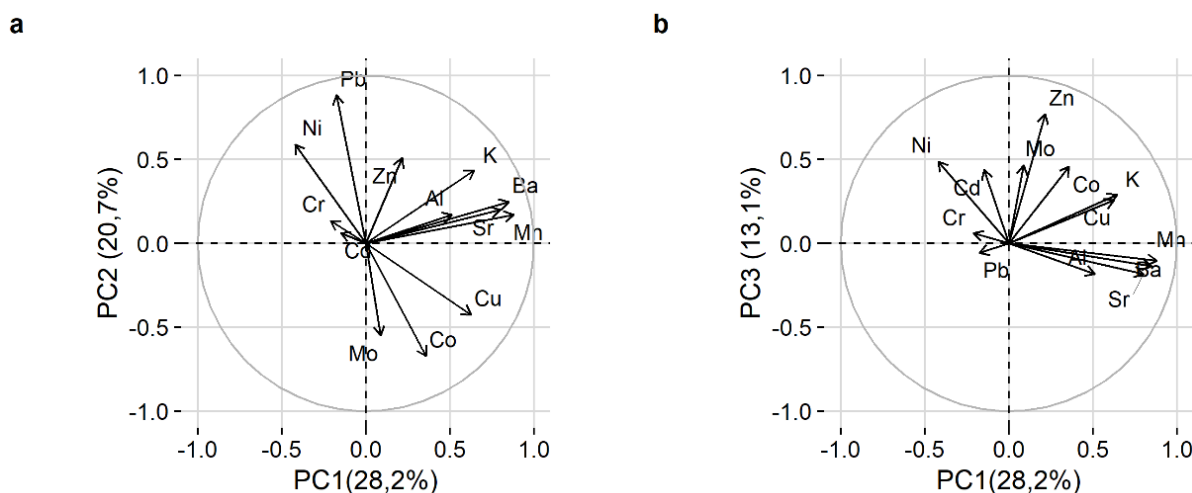
A Figura 23 apresenta os padrões dos *scores* médios da PC1 (Figura 23a), da PC2 (Figura 23b) e da PC3 (Figura 23c) das variáveis metais ao longo do tempo agrupadas em tratamentos. O Apêndice A4 mostra o padrão da PC1 *versus* PC2 (Apêndice A4a, A4c, A4e e A4g) e da PC1 *versus* PC3 (Apêndice A4b, A4d, A4f e A4h) das variáveis metais em cada tratamento, representada pelos mesocosmos ao longo do tempo.



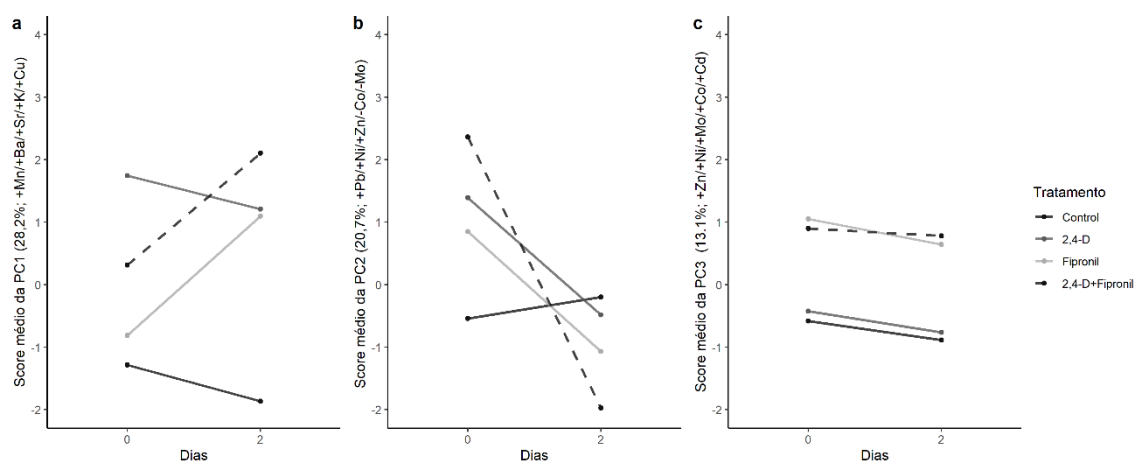
**Figura 20.** Análise *Parallel* da análise de componentes principais/ *principal components analysis* (PCA) dos metais nos mesocosmos durante o experimento. Component number= número de componentes; valores eigen das componentes principais; PC actual data= dados atuais da PC; PC simulated data = dados simulados das PC; e PC resampled data= dados reamostrados da PC.



**Figura 21.** Contribuição das variáveis (%) da análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) para: **a)** componente principal/*principal component* (PC) 1; **b)** PC2; e **c)** PC3. Al= alumínio, Ba= bário, Cd= cádmio, Co=cobalto, Cr= cromo, Cu= cobre, K = potássio, Mn = manganês, Mo= molibdênio, Ni= níquel, Pb= chumbo, Sr= estrôncio e Zn= zinco. As linhas pontilhadas vermelhas correspondem ao valor esperado caso a contribuição fosse uniforme. As contribuições acima da linha de referência podem ser consideradas como contribuições importantes para a PC.



**Figura 22.** Análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) dos metais e suas componentes principais/*principal component* (PC): **a)** PC1 versus PC2; e **b)** PC1 versus PC3. Al= alumínio, Ba= bário, Cd= cádmio, Co=cobalto, Cr= cromo, Cu= cobre, K = potássio, Mn = manganês, Mo= molibdênio, Ni= níquel, Pb= chumbo, Sr= estrôncio e Zn= zinco. As flechas representam a magnitude e a direção da contribuição de cada uma das variáveis.



**Figura 23.** Scores médios das componentes principais/*principal components* (PC) dos metais ao longo do tempo por tratamento. **a)** PC1 foi gerada pela contribuição das variáveis Mn=manganês, Ba= bário, Sr= estrôncio, K= potássio e Cu= cobre. **b)** PC2 foi gerada pela contribuição das variáveis Pb= chumbo, Ni= níquel, Zn= zinco, Co= cobalto e Mo= molibdênio. E **c)** PC3 foi gerada pela contribuição das variáveis Zn, Ni, Mo, Co e Cd=cádmio. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). “+” significa que a PC se relaciona positivamente com a variável. “-” significa que a PC se relaciona negativamente com a variável. As barras representam os valores médios + os desvios padrão. Control = tratamento Controle.

### 6.1.6 Discussão

#### *Análise dos efeitos dos agrotóxicos nas características limnológicas dos mesocosmos*

Com base nas análises realizadas para as variáveis física, químicas e de nutrientes, não foram verificadas alterações nas características limnológicas dos mesocosmos em função da contaminação pelos agrotóxicos fipronil e 2,4-D, uma vez que os tratamentos Controle e aqueles que receberam os agrotóxicos seguiram um mesmo padrão ao longo do tempo. As mudanças que ocorreram mostraram estar associadas com fatores sazonais (climatológicos) e ecológicos dos próprios mesocosmos. Comparando nossos resultados com outros estudos que avaliaram os efeitos dos agrotóxicos nos ecossistemas aquáticos por meio de mesocosmos, a maioria deles demonstrou que não existe uma relação clara e consistente das alterações na qualidade da água com o aporte dos agrotóxicos.

Como observado na atual pesquisa, as mudanças apresentadas por diversos autores parecem ter relação com a sazonalidade dos mesocosmos. FINNEGAN *et al.* (2018), por exemplo, não encontraram nenhuma resposta consistente na variação dos parâmetros físico-químicos devido à aplicação do inseticida tiametoxam (Bracknell,

Berkshire, Inglaterra). LOZANO *et al.* (2020), testando os herbicidas glifosato e 2,4-D, isolados e em mistura, também obtiveram uma variação similar dos parâmetros físico-químicos e nutrientes entre os tratamentos e controle, exceto pela variável Cla, a qual teve um aumento e uma diminuição nos tratamentos com a maior concentração de glifosato e a menor concentração do tratamento mistura, respectivamente (Buenos Aires, Argentina). DENOYELLES, KETTLE e SINN (1982), no entanto, demonstraram que o herbicida atrazina alterou o pH e OD do ambiente aquático (Lawrence, Kansas, Estados Unidos). HAYASAKA *et al.* (2012a) não observaram diferenças nos parâmetros físico-químicos entre os tratamentos com os inseticidas imidacloprid e fipronil, aplicados de forma isolada, e o controle, exceto pela turbidez, que teve um decréscimo no mesocosmos contaminado com imidacloprid (Tsukuba, Japão). PEREIRA, CEREJEIRA e DAAM (2017) mencionaram que o herbicida terbutilazina e o inseticida clorpirifós, isolados e em mistura, divergiram entre os tratamentos para o OD e Cla, mas não para os outros parâmetros físico-químicos e nutrientes (Lisboa, Portugal). Um ponto em comum em todos os dados apresentados pelos diferentes autores é que os efeitos se manifestam de forma indireta, muito em função da forma de ação do agrotóxico.

Ao longo de todo o experimento os valores médios de pH na água dos mesocosmos variaram de 5,51 à 6,92. A maior parte dos lagos abertos apresentam um pH entre 6,00 e 9,00 (WETZEL, 2001), assim a característica de um pH levemente mais baixo na água dos mesocosmos pode ser consequência de alguns fatores como: *i*) o baixo pH da água de origem do SAG (GASTMANS; CHANG; HUTCHEON, 2010); *ii*) o solo do Cerrado (SOUSA; LOBATO, 2004); *iii*) a decomposição da matéria orgânica (ESTEVES, 1998); e *iv*) a precipitação (CHARLSON; RODHE, 1982; ESTEVES, 1998). Características físico-químicas das águas continentais dependem da bacia de drenagem (*i.e.* geologia, clima, solo, movimentos da água ao longo da área, mudanças biogeoquímicas, como mencionado por TUNDISI e MATSUMURA-TUNDISI (2017) e WETZEL (2001), das atividades antropogênicas (KHATRI; TYAGI, 2015), entre outros). O processo de decomposição gera CO<sub>2</sub> na água que diminui o pH (ESTEVES, 1998). Ainda, a matéria orgânica dissolvida pode derivar da decomposição como ácido orgânico dos compostos húmicos (WETZEL, 2001). Em relação à chuva, o seu pH natural é levemente ácido (5-6), mas ela pode mudar de composição para chuva ácida devido as atividades humanas (LARA *et al.*, 2001). Entretanto, os efeitos da chuva no pH da água

continental só são relevantes quando o sistema têm água pobre na capacidade de tamponamento (capacidade de neutralização ácida)(ESTEVEVES, 1998; KRUSCHE *et al.*, 2003). Neste estudo, não foram avaliados os efeitos de tamponamento da água dos mesocosmos e nem os valores de pH da chuva, o que dificulta uma conclusão melhor sobre o assunto.

De acordo com a PCA das variáveis físicas e químicas, a PC1 é explicada e relacionada positivamente ao pH, Cla e Clb, e está representando os processos relacionados com a fotossíntese. A clorofila-*a* é uma medida indireta da biomassa fitoplanctônica (ALEMAYEHU; HACKETT, 2016; BASAK; WAHID; DINH, 2021) e em lagos tropicais a clorofila é controlada principalmente pelos nutrientes e a disponibilidade da radiação solar (ESTEVEVES, 1998). O fitoplâncton é responsável por realizar a fotossíntese, a qual pode reduzir rapidamente o CO<sub>2</sub> e aumentar o pH (*i.e.* a flutuação diurna do pH em alguns lagos pode ir de 10, no final da tarde, a valores menores que 8, no período noturno) (WETZEL, 2001). Assim, a variação temporal do pH está relacionada com a fotossíntese e as mudanças no equilíbrio entre CO<sub>2</sub> e carbonato-bicarbonato (BHATERIA; JAIN, 2016; WETZEL, 2001). Por ser a PC1 a PC que mais explica a variância dos dados físicos e químicos (e a única retida pela análise *Parallel*), pode-se dizer que o processo da fotossíntese é o que mais influenciou nas mudanças físico e química dentro dos mesocosmos.

Ao longo do experimento, os mesocosmos também apresentaram valores médios de OD baixos, variando de 0,70 à 5,38 mg L<sup>-1</sup>. A temperatura é um fator importante na solubilidade do OD e durante o período experimental a média de temperatura da água na região de Itirapina foi de 25,7 ±2,57 °C, variando de 16,4 à 29,8 °C. Temperaturas mais elevadas são características de ambientes tropicais e estas diminuem a solubilidade do OD na água, enquanto temperaturas mais baixas aumentam a solubilidade deste gás na água (THORNTON; KIMMEL; PAYNE, 1991; US EPA, 2022a; WETZEL, 2001). Além disso, altas temperaturas aceleram os processos de respiração e de decomposição da matéria orgânica (ESTEVEVES, 1998; US EPA, 2022a), os quais consomem oxigênio (US EPA, 2022a; WETZEL, 2001). Os mesocosmos comportavam uma grande biomassa de macrófitas e este aspecto provavelmente desencadeou o decaimento do oxigênio no ambiente aquático como consequência da alta taxa de respiração pelas plantas de noite e a grande demanda de oxigênio para a decomposição da matéria orgânica originada pelas

macrófitas (ESTEVEES, 1998; US EPA, 2022a). Os valores de OD foram monitoradas durante o período da manhã, porém, em lagos tropicais, existe uma grande variação diária devido a fotossíntese, a respiração e a decomposição, as quais podem levar a altos níveis de OD durante o dia e até condições anóxicas durante o período da noite (ESTEVEES, 1998; US EPA, 2022a; WETZEL, 2001).

A PC2 das variáveis físicas e químicas explicou positivamente a variância longitudinal da Turbidez e OD por influência do fitoplâncton (Cla e Clb). O crescimento do fitoplâncton aumenta a fotossíntese (a qual é uma importante fonte de oxigênio nos ecossistemas aquáticos), a concentração de oxigênio dissolvido (KALAJI *et al.*, 2014; RABINOWITCH; GOVINDJEE, 1965; WETZEL, 2001) e a turbidez na água (WETZEL, 2001). A turbidez é uma medida da claridade da água devido a presença de material suspenso (WETZEL, 2001), os quais incluem várias partículas, como por exemplo, do solo (argila, silte e areia), microalga e matéria orgânica morta (SCHEFFER, 2004; US EPA, 2012). No dia 45 o aumento da turbidez é consequência do aumento do fitoplâncton, o qual aumentou a concentração de OD na água.

Por outro lado, a PC3 explica positivamente a variância da turbidez e negativamente a variância do OD, indicando que nos mesocosmos também houve mudanças na turbidez e no OD sem serem originados pela contribuição do fitoplâncton/partículas de microalgas, mas sim devido a ressuspensão do sedimento do fundo como resposta a turbulência causada pela ação do vento (BLINDOW; HARGEBY; HILT, 2014; JÓNASSON; ADALSTEINSSON, 1979). Embora, a turbulência pelo vento aumente a difusão do oxigênio da atmosfera para a água (US EPA, 2022a), ela também favorece o aumento da turbidez na água como consequência da ressuspensão do sedimento do fundo, o qual é intensificado em lagos rasos (BLINDOW; HARGEBY; HILT, 2014; SCHEFFER, 2004). A diminuição do OD nos mesocosmos devido a ressuspensão do sedimento e aumento da turbidez pode ser explicado por dois fatores: *i*) a ressuspensão de material orgânico em decomposição, o qual demanda oxigênio (ESTEVEES, 1998; US EPA, 2022a; WETZEL, 2001); e *ii*) a diminuição da penetração da luz no ecossistema aquático devido a alta turbidez, a qual afeta negativamente o processo de fotossíntese (Cla e Clb) e consequentemente a produção de oxigênio (JÓNASSON; ADALSTEINSSON, 1979; WETZEL, 2001).

Vale ressaltar, que a maioria dos organismos fitoplânctônicos não possuem movimentos e acabam sedimentando no fundo do lago, assim ao ressuspender o sedimento o vento também estará incrementando fitoplâncton na coluna d'água (ESTEVEZ, 1998). Porém é preciso considerar a presença das macrófitas e também o seu grupo funcional nos mesocosmos, pois estas podem influenciar na dinâmica tanto da turbidez, quanto do fitoplâncton e vice-versa (MOI *et al.*, 2021; THEY; MARQUES, 2019). Em lagos rasos, macrófitas flutuantes, macrófitas submersas e fitoplâncton competem pelos mesmos recursos, como a luz e os nutrientes (SCHEFFER, 1990; SCHEFFER; VAN NES, 2007) e para competir com o fitoplâncton, as macrófitas produzem compostos alelopáticos (BLINDOW; HARGEBY; HILT, 2014). Assim, mesmo com a presença de células de fitoplâncton no sedimento ressuspensão dos mesocosmos, o crescimento da biomassa fitoplanctônica foi impedido devido a competição com as macrófitas.

Nos dias -7, 0 e 2 os valores de Cla e a Clb estavam mais baixos e do OD mais alto, indicando a provável dominância por macrófitas nos mesocosmos, principalmente pelas flutuantes. O fitoplâncton e as macrófitas flutuantes estão mais adaptadas a altas concentrações de nutrientes no ambiente (MOI *et al.*, 2021; SCHEFFER, 1990) e o aumento desses dois grupos diminui a disponibilidade de luz para as macrófitas submersas (SCHEFFER, 1990; THEY; MARQUES, 2019). Contudo, a partir do dia 2 ao dia 14, devido ao aumento da turbidez as macrófitas submersas foram negativamente afetadas. As macrófitas submersas estão mais adaptadas a baixas concentrações de nutrientes e favorecerem a redução da ação do vento sobre o fundo, reduzindo a ressuspensão de sedimento (BLINDOW; HARGEBY; HILT, 2014; HAMILTON; MITCHELL, 1996).

Durante o experimento, algumas macrófitas eram amostradas em cada coleta para analisar os efeitos tóxicos dos agrotóxicos nessas plantas (YOSHII, 2022). Assim, a remoção das macrófitas dos mesocosmos, a baixa concentração de Cla e Clb e a alta turbidez devido a ressuspensão de material em decomposição, nos dias 4, 7 e 14, potencializaram a queda do OD. Por um outro lado, a retirada das macrófitas dos sistemas contribuiu para a mudança da dinâmica desse ambiente por meio da diminuição da competição entre elas e o fitoplâncton. Assim, devido a menor competição por nutrientes, houve o crescimento do fitoplâncton, o qual foi visível no dia 21.



A predação do zooplâncton sobre o fitoplâncton é outro fator importante na redução da Cla e Clb (THEY; MARQUES, 2019), o que será discutido detalhadamente no Capítulo 2 desta tese. Neste capítulo procurou-se analisar as mudanças causadas pelos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, nas características limnológicas dos mesocosmos, incluindo os metais (como será abordado ainda neste capítulo), devido a sua importância como um cenário/*background* às respostas dos processos que ocorrem dentro do sistema.

A turbidez explicada pela PC3 tem contribuição dos nutrientes (HAMILTON; MITCHELL, 1996; ZINGEL *et al.*, 2006). De acordo com WETZEL (2001) geralmente as partículas inorgânicas que compõem a turbidez consistem de silicato, alumínio e óxidos de ferro. A média da concentração de SiO<sub>2</sub> e turbidez durante todo o experimento seguiram um padrão similar. A alta concentração de SiO<sub>2</sub> na água tem como origem a água do poço (SAG), como resultado de reações de intemperismo (CONLEY; SCHELSKE; STOERMER, 1993). GASTMANS, CHANG e HUTCHEON (2010) relataram altas concentrações de sílica dissolvida na área de afloramento do SAG. Também, de acordo com WETZEL (2001), águas subterrâneas em contato com rochas vulcânicas e sedimento contendo feldspato apresentam uma grande concentração de sílica (a área de afloramento/recarga do SAG é composta por dissolução do cimento de feldspato em arenitos intercalado com rochas basálticas) (GASTMANS; CHANG; HUTCHEON, 2010; RABELO; WENDLAND, 2010)).

Em relação aos nutrientes, embora a PC1 (21,70%) explique a maior porcentagem da variância dos dados, as porcentagens da variância explicada entre as PCs (PC2 17,60%, PC3 14,20% e PC4 13,10%) têm valores próximos e mais homogêneas distribuídos quando comparada a PCA das variáveis físicas e químicas. Portanto, a importância dos nutrientes que contribuem para estas PCs, tem um papel chave na variação da dinâmica dos nutrientes dentro dos mesocosmos durante o período avaliado.

Os nutrientes PI, PTD e PT explicam com uma relação positiva a PC1. Esta PC está descrevendo os processos físico-químicos e biológicos do ciclo do fósforo no sistema, como a assimilação pelos organismos fotossintetizantes, reciclagem/decomposição dos nutrientes, imobilização e liberação do fósforo do sedimento. A transformação de muitas formas do fósforo não disponíveis para ser assimilado na fotossíntese para formas disponíveis (PI) é rápida, *i.e.* a reciclagem do

fósforo dentro do fitoplâncton pode ser rápida, e o fósforo inorgânico particulado pode se tornar disponível na coluna d'água através da dessorção e dissolução (RIGLER, 1956; SCHEFFER, 2004). No verão, a matéria orgânica morta ao precipitar para o sedimento se decompõe e mineraliza rapidamente, devido às altas temperaturas (SCHEFFER, 2004).

Lagos tropicais rasos apresentam uma dinâmica intensa de troca de fósforo entre o sedimento e água, o que favorece a entrada rápida de fósforo mineralizado para a coluna d'água (SCHEFFER, 2004). O Al (LIJKLEMA, 1994), carbonato de cálcio (precipitado durante a fotossíntese) (CRAWFORD, 1977; LIJKLEMA, 1994) e o ferro (MORTIMER, 1942) podem imobilizar o fósforo no sedimento, principalmente o ferro que é o imobilizador dominante nesse processo (SCHEFFER, 2004). O solo do CRHEA é rico em  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (DOS SANTOS *et al.*, 2018), o SAG é classificado como águas Ca-Mg- $\text{HCO}_3$  (GASTMANS; CHANG; HUTCHEON, 2010) e nosso resultado para a concentração média de Al mostrou a presença deste metal em valores de  $\text{mg L}^{-1}$  em todos os tratamentos nos dias 0 e 2 d. Portanto, o fósforo pode ter sido imobilizado por esses compostos no sedimento dos mesocosmos. Porém, a ligação ferro-fósforo no sedimento, sob condições anaeróbicas, é quebrada e o fósforo é liberado para a coluna d'água, entrando em solução (MORTIMER, 1942). Os valores de OD nos mesocosmos ao longo do experimento foram baixos, chegando a valores próximos à zero em alguns períodos. Porém, devido a variação diária do OD, e considerando que as variáveis foram monitoradas no período da manhã, os valores de OD podem ter atingido condições anóxicas durante o período da noite (ESTEVES, 1998; WETZEL, 2001). Essa mudança diária do OD pode ter sido um dos fatores que mais influenciou a variação da concentração do PI ao longo do experimento. Além disso, altos valores de pH podem também participar como agentes na diminuição da ligação entre ferro-fósforo (SCHEFFER, 2004). Da mesma forma que o OD esta variável também apresenta uma flutuação diária em seus valores devido a fotossíntese (como foi discutido anteriormente) (WETZEL, 2001). Entretanto, no caso deste estudo, mesmo considerando a variação diária do pH, acredita-se que o mesmo não afetou significativamente na liberação de fósforo neste período experimental, já que o pH variou de 5,51 a 6,92, ou seja, de levemente ácido à neutro.

A relação entre os processos de decomposição da matéria orgânica, ressuspensão do sedimento/matéria orgânica, amonificação ( $\text{NH}_4$  é o primeiro produto da decomposição da matéria orgânica) e da absorção de nutrientes pelo fitoplâncton e

macrófitas foi representada pela PC2. As variáveis que mais contribuíram para a PC2 foram NTK,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{NH}_4$  e PT. O NTK (a variável que mais contribuiu para a PC2) indica a soma do nitrogênio orgânico mais o nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4$ ) (DENG *et al.*, 2021). No dia 0, de acordo com a PC2, a concentração de NTK,  $\text{NH}_4$  e PT nos mesocosmos estava maior em relação a outros dias da coleta. O  $\text{NH}_4$  é a fonte de nitrogênio mais assimilável pelas microalgas e macrófitas, e na zona trofогênica o  $\text{NH}_4$  é rapidamente assimilado por elas (CEDERGREEN; MADSEN, 2002; FANG *et al.*, 2007; WETZEL, 2001). Também, segundo RODRÍGUEZ-GALLEGO *et al.* (2004), altas concentrações de nutrientes podem significar que eles excederam a capacidade de assimilação das macrófitas presentes no ecossistema. Logo, podemos assumir que a decomposição da matéria orgânica neste momento foi mais significativa que o processo de absorção de nutrientes. Do dia 2 ao dia 7, houve um pico da concentração de  $\text{SiO}_2$ . A concentração de  $\text{SiO}_2$  na água está essencialmente ligada a assimilação deste nutriente por diatomáceas para a construção de suas frústulas (CONLEY; SCHELSKE; STOERMER, 1993; WETZEL, 2001). Assim, quando as diatomáceas sedimentam ao fundo acarretam o acúmulo de sílica biogênica no sedimento, a qual será reciclada por processos de dissolução formando sílica dissolvida (CONLEY; SCHELSKE; STOERMER, 1993; WETZEL, 2001). Dessa forma, neste período a  $\text{SiO}_2$  retornou à água por causa da ação do vento sobre o sedimento. De acordo com SCHALLENBERG e BURNS (2004) o sedimento ressuspensão sustenta o crescimento do fitoplâncton, já que retorna tanto nutrientes e microalgas do fundo para a coluna d'água. Contudo, a PC2 está explicando a absorção de nutrientes pelas macrófitas e fitoplâncton durante o período em que houve a ressuspensão do sedimento. Provavelmente a relação negativa e positiva da  $\text{SiO}_2$  e dos demais nutrientes (que contribuíram para PC2) com a PC2, respectivamente, durante o período da ressuspensão é devido a sílica ser assimilada apenas por diatomáceas, enquanto os outros nutrientes são absorvidos tanto por macrófitas e o fitoplâncton (incluindo as diatomáceas) (CONLEY; SCHELSKE; STOERMER, 1993; WETZEL, 2001). Consequentemente, a concentração de nitrogênio e fósforo reduziram mais rápido que a  $\text{SiO}_2$ . Estes resultados estão alinhados com os dados de Cla e Clb, que a partir do dia 14 apresentaram valores mais elevados.

As variáveis  $\text{NO}_3$  (41,30%),  $\text{NH}_4$  (29,45%) e  $\text{NO}_2$  (19,73%) foram as mais importantes na PC3, a qual explica os processos de nitrificação, desnitrificação, absorção

de  $\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4$ , e a perda de nitrogênio para a atmosfera. Estas dinâmicas estão diretamente relacionadas com a produção e decomposição de matéria orgânica (ESTEVEVES, 1998). A alta concentração de  $\text{NH}_4$  e  $\text{NO}_3$  no dia 0 demonstra que a amonificação e a nitrificação estavam ocorrendo durante este dia em conjunto com a decomposição da matéria orgânica e a baixa absorção por macrófitas e fitoplâncton desses nutrientes. A nitrificação é mais intensa em temperaturas altas e ocorre em ambientes ricos em OD, que através da oxidação do  $\text{NH}_4$  o transforma sequencialmente em  $\text{NO}_2$  e depois em  $\text{NO}_3$  (SCHEFFER, 2004). Porém, em condições de baixo oxigênio a nitrificação é interrompida e o nitrogênio permanece na forma de  $\text{NH}_4$  (WETZEL, 2001). Embora os mesocosmos não apresentaram altos níveis de OD ao longo do experimento, enfatiza-se novamente que as coletas procederam durante o período da manhã e que existe uma variação diária do OD (ESTEVEVES, 1998; WETZEL, 2001). Além disso, de acordo com WETZEL (2001) a nitrificação pode acontecer por volta de concentrações de OD de até  $0,30 \text{ mg L}^{-1}$ . Do dia 4 ao dia 73 tanto a absorção desses nutrientes por organismos fotossintetizantes, bem como a desnitrificação com perda de nitrogênio para atmosfera conduziram a dinâmica no sistema, já que as concentrações desses nutrientes reduziram bastante (SCHEFFER, 2004; WETZEL, 2001). A desnitrificação é gerida por ambientes com baixo OD, o qual, por redução do  $\text{NO}_3$ , o transforma em  $\text{N}_2$ . Ainda, os mecanismos de nitrificação e desnitrificação ocorrem simultaneamente (ESTEVEVES, 1998; WETZEL, 2001).

A PC4 nos mostra a competição entre o PTD e o  $\text{SiO}_2$  por sítios de ligação comuns, além da ressuspensão do sedimento acrescentando nutrientes na coluna d'água. Tanto o PTD quanto o  $\text{SiO}_2$  competem pelos mesmos locais de sorção do ferro e do Al (KOSKI-VÄHÄLÄ; HARTIKAINEN; TALLBERG, 2001). Em condições de anoxia o fósforo e a sílica se dissolvem no sedimento (WETZEL, 2001), porém a relação de adsorção desses dois elementos com o ferro depende do pH (SABUR *et al.*, 2022). Durante o experimento a concentração de OD foi baixa e, da mesma forma, o pH foi levemente ácido do dia -7 ao dia 30, e do dia 45 ao dia 73 o pH aumentou para neutro. Segundo SABUR *et al.* (2022) a ligação entre o fosfato e o ferro (goethite) se fortalece em pH 4 e diminui conforme o pH aumenta. Entretanto, devemos considerar novamente a variação diária desses dois parâmetros, pois os mesmos dependem da fotossíntese, como foi discutido anteriormente.

As maiores concentrações do PTD nos dias 0, 2 e 73 estão alinhados com as menores concentrações de OD e as menores concentrações de  $\text{SiO}_2$  medidas na coluna

d'água. Provavelmente a alta concentração do SiO<sub>2</sub> dissolvido na água intersticial liberou o PTD para a água. Altas concentrações de SiO<sub>2</sub> podem liberar o fosfato por meio da redução da adsorção no ferro quando o pH está acima de 7 (KOSKI-VÄHÄLÄ; HARTIKAINEN; TALLBERG, 2001) e após essa liberação o fosfato procura ligar-se ao Al, porém o SiO<sub>2</sub>, em maiores concentrações, também reduz a readsorção do fosfato ao Al (KOSKI-VÄHÄLÄ; HARTIKAINEN; TALLBERG, 2001). A maior concentração do SiO<sub>2</sub> do dia 2 ao dia 14 foi consequência da turbulência devido a ação do vento. Portanto, o sedimento estava mais livre do SiO<sub>2</sub> e deixando locais de ligação ao ferro e Al disponíveis para a adsorção do PTD, o qual diminuiu na coluna d'água neste período.

A PC4 revela as relações positivas entre a ressuspensão do sedimento e o enriquecimento por nutriente na água, já que a SiO<sub>2</sub>, NTK e PT estão positivamente relacionadas a esta PC, coincidindo também com a ação do vento neste período. Como mencionado anteriormente, o vento incrementa nutrientes na coluna d'água devido à ressuspensão do sedimento do fundo (SCHALLENBERG; BURNS, 2004). Ainda, as relações negativa e positiva do PTD e do PT com a PC4 podem indicar que frações do fósforo particulado aumentaram na água quando o sedimento foi ressuspense pelo vento. Assim, a fração particulada do fósforo contribuiu mais para o PT durante este período, enquanto o PTD foi imobilizado devido ao aumento das ligações com ferro e Al no sedimento.

Outra análise realizada nesta pesquisa foi a concentração de metais na água dos mesocosmos. PINTO *et al.* (2023) avaliaram a concentração dos metais Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Pb, Mn, Ni, K e Zn nos sedimentos dos mesocosmos deste estudo e no mesmo período em um experimento paralelo a este. Os autores observaram concentrações similares desses metais em todos os tratamentos (incluindo o controle), com exceção do metal Ba, com concentração bem menor no controle em relação aos outros tratamentos. Assim, muito dos metais já estavam presentes nos sistemas antes da contaminação, sendo esses decorrentes da própria composição química do solo, o qual foi utilizado para compor a estrutura experimental dos mesocosmos (como sedimento). Ou seja, a alta concentração de alumínio na água se deve ao tipo de solo que foi adicionado aos mesocosmos, que como já foi mencionado anteriormente é rico neste metal (DOS SANTOS *et al.*, 2018; EMBRAPA, 2004; SANTOS; TREVISAN; MOSCHINI, 2018; TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2014).

A PC1 dos metais explicou a maior parte da variação dos metais nos mesocosmos, sendo Mn, Ba, Sr, K e Cu as variáveis que contribuíram positivamente para a PC1. Esta PC está relacionada com o efeito da interação entre os metais que já estavam nos mesocosmos e os agrotóxicos, bem como a contaminação por Ba nos mesocosmos dos tratamentos contendo agrotóxicos. Os produtos inertes (p.i.) nas formulações dos agrotóxicos podem ser surfactantes, preservativos, solventes, entre outros (COX; SURGAN, 2006; US EPA, 2022) e segundo BEVERIDGE e PICKERING (1983) alguns surfactantes diminuem a adsorção de metais à argila, pois os dois competem pelo mesmo sítio de ligação, fazendo com que os metais sejam liberados na coluna d'água e entre em solução. Assim, há a possibilidade de Mn, Sr, K e Cu terem sido liberados do sedimento devido à interação com as formulações comerciais dos agrotóxicos usados. Em relação ao aumento da concentração de Ba nos mesocosmos contaminados, pode ser devido ao uso dessa substância nas formulações comerciais dos agrotóxicos. Estudos já quantificaram a presença de metais utilizados como p.i. em formulações comerciais de agrotóxicos (ABDALLAH ALNUWAISER, 2019; DEFARGE; SPIROUX DE VENDÔMOIS; SÉRALINI, 2018; JACQUES *et al.*, 2019). Vale ressaltar que nos produtos técnicos destinados a obtenção de produtos formulados ou pré-misturas de 2,4-D e fipronil há a presença de metais como impurezas, sendo os metais identificados para: 2,4-D = Cr ( $<0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Cd ( $<0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Pb ( $<0,44 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Arsênio (As) ( $<9,20 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$ ), e mercúrio (Hg) ( $<0,60 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) (IBAMA, 2019a); e fipronil = Cr ( $<0,30 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Cd ( $<0,10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Pb ( $<0,20 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), As ( $<0,20 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), e Hg ( $<0,10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) (IBAMA, 2019b).

A PC2 explica a interação dos metais Pb, Co, Ni, Mo e Zn com os agrotóxicos e com alguns fatores limnológicos como os nutrientes. Pb, Ni e Zn apresentaram uma diminuição nas suas concentrações no dia 2 quando houve o aumento da turbidez no sistema, assim, provavelmente existe uma interação entre o material ressuspense do sedimento (como matéria orgânicas e nutrientes), metais e agrotóxicos. Metais podem adsorver em partículas e complexarem com a matéria orgânica (PENEZIC *et al.*, 2022). Da mesma forma que há surfactantes que ao interagirem com certos metais os liberam para a coluna d'água, existem os que complexam com os metais, diminuindo a concentração dos mesmos na água (BEVERIDGE; PICKERING, 1983). Além disso, há certos i.a., como por exemplo o fungicida carbendazim, que complexam com os metais

(DA SILVA SANTOS *et al.*, 2020). Porém, segundo o IBAMA, os agrotóxicos 2,4-D e fipronil não formam complexos em meio aquoso com os metais Cd, Pb e Cu (IBAMA, 2019a, 2019b). Já Co e Mo apresentam um comportamento contrário, em que há o aumento de suas concentrações no dia 2, quando há o aumento da turbidez no sistema. Provavelmente as interações com o sedimento ressuspensão, a ação do vento e agrotóxicos levaram esses dois elementos a entrarem em solução. Durante a decomposição e mineralização da matéria orgânica, Mo e Co são os primeiros metais a entrarem em solução (WETZEL, 2001) e o Mo apresenta uma grande mobilidade (a entrar na fase solúvel) em relação a muitos metais (WETZEL, 2001). Como discutido no parágrafo acima, há p.i. nas formulações dos agrotóxicos que competem com os metais por sítios de ligação em comuns. Assim, as interações dos agrotóxicos com a ressuspensão de Mo e Co devido à ação do vento e em conjunto com a característica física de maior solubilidade desses dois elementos, podem explicar a elevação da concentração deles nos tratamentos contendo agrotóxicos no dia 2.

Os metais Zn, Ni, Mo, Co e Cd estão relacionados positivamente com a PC3, a qual não demonstra variações entre 0 d e 2 d. Porém, houve a variação dessa PC entre o controle e os tratamentos contaminados com fipronil (Fipronil e 2,4-D+Fipronil). Esta PC3 descreve os processos da interação entre esses metais e as variáveis limnológicas físicas, como o pH e OD. Já no caso dos tanques contaminados com fipronil houve a interação entre os metais, as variáveis físicas e também a formulação comercial do agrotóxico, com o aumento da concentração Zn, Ni, Mo, Co e Cd, comparado com os outros tratamentos. O pH é uma variável importante no controle do comportamento de muitas variáveis dentro dos ecossistemas aquáticos, inclusive os metais (SAALIDONG *et al.*, 2022; WANG; MEADOR; LEUNG, 2016) e a mesma não sofreu grandes alterações nos mesocosmos entre os dias 0 e 2. O pH, através da PCA das variáveis físicas e químicas dos mesocosmos deste estudo, foi apontado como uma que mais colaborou para a PC1, ou seja, contribuindo para a explicação da maior percentagem da variação dos fatores físicos e químicos no experimento. De acordo com WANG; MEADOR e LEUNG (2016) a relação entre um pH baixo e o aumento da solubilidade/ou alteração da especiação dos metais é a que mais explica a disponibilidade dos metais no ambiente aquático. O OD também não apresentou uma variação relevante entre os dias 0 e 2. Esta

variável influência as reações de oxidação e redução, e em baixos valores o OD aumenta a liberação de metais precipitados (US EPA, 2022a).

#### **6.1.7 Conclusão**

Os agrotóxicos não causaram mudanças nas variáveis limnológicas (pH, OD, turbidez, clorofila e nutrientes) nos mesocosmos. Porém, nos tratamentos contaminados com fipronil e 2,4-D, isolados e em mistura, verificou-se o aumento na concentração de metais. A análise realizada permite inferir que as interações entre os agrotóxicos, os metais e os fatores limnológicos alteraram a dinâmica dos metais do próprio sistema, com exceção do metal Ba, que teve um aumento na sua concentração nos mesocosmos devido a aplicação dos próprios agrotóxicos.



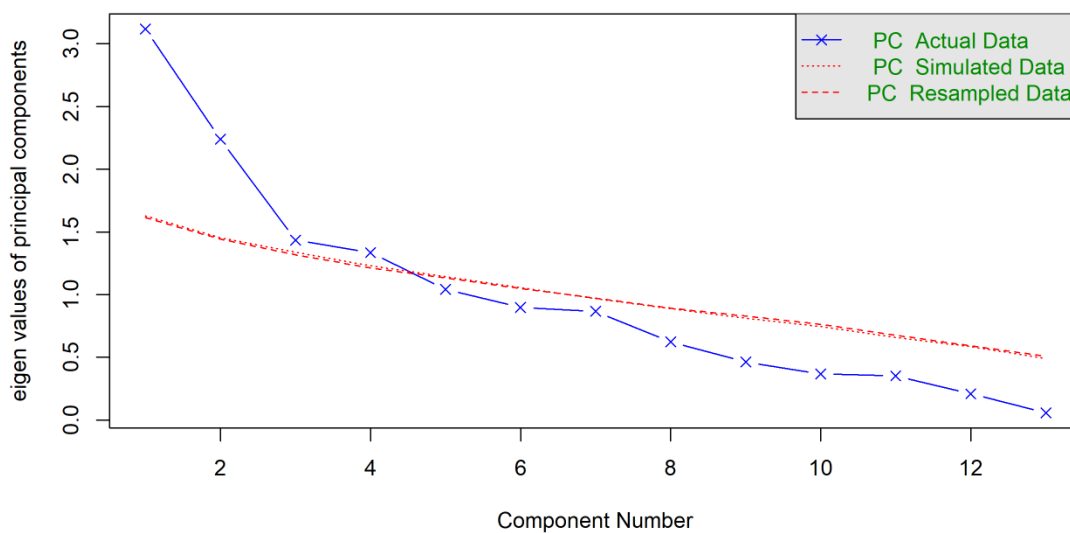
## **6.2 CAPÍTULO 2: COMUNIDADE ZOOPLÂNTONICA COMO BIOINDICADORA DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE 2,4-D E FIPRONIL, ISOLADOS E EM MISTURA**

Neste Capítulo da tese, os resultados e discussão estão apresentados de forma conjunta, sendo que ao final estão incluídas as principais conclusões da pesquisa. Ressalta-se, inicialmente, que para uma melhor avaliação dos resultados, na análise estatística realizada para as variáveis abióticas não foi feita a separação dos dados obtidos em campo e nutrientes, sendo estes avaliados de forma conjunta. Além disso, os resultados de metais não foram incorporados na análise, uma vez que esses foram quantificados somente para duas amostragens, as quais não tinham correspondência direta com as coletas da comunidade zooplanctônica.

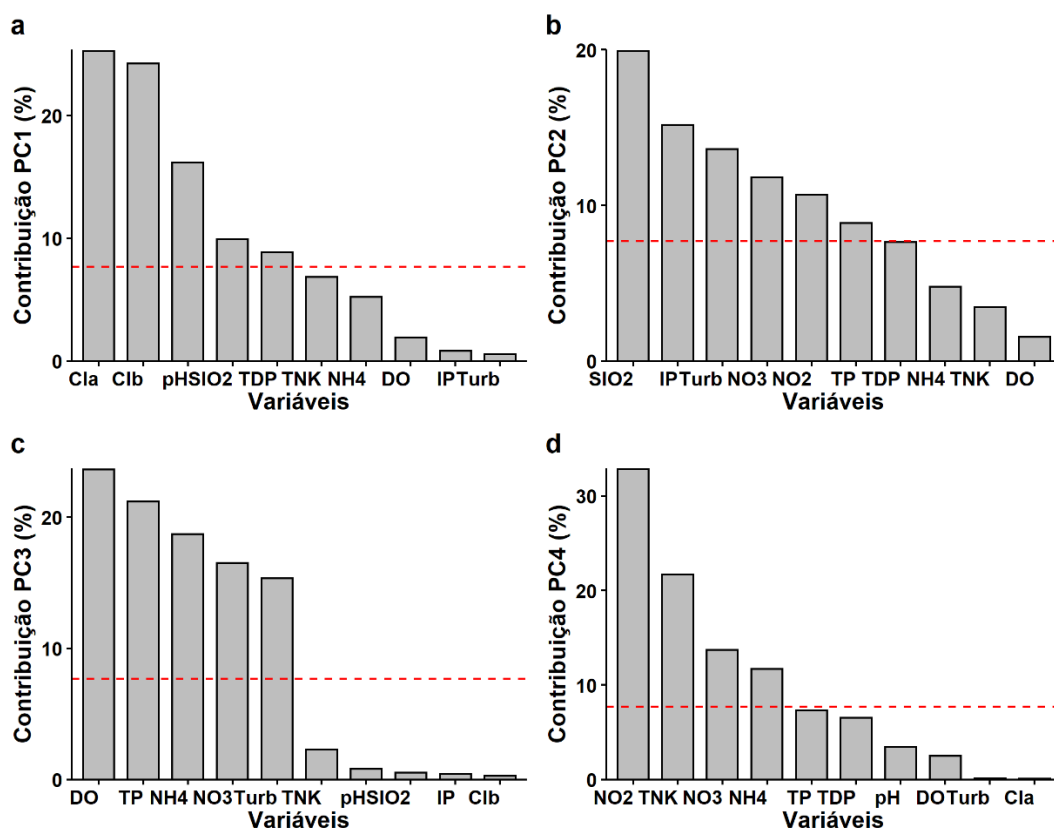
### **6.2.1 Caracterização limnológica dos mesocosmos**

A variável condutividade elétrica (CE) não contribuiu para nenhuma das PCs na PCA das variáveis físicas e químicas do Capítulo 1, por isso ela não foi incluída no subconjunto dos dados desta nova PCA. A análise *Parallel* (Figura 24) dessa PCA reteve a PC1, a PC2, a PC3 e a PC4, as quais explicaram 24,00%, 17,20%, 11,00% e 10,30% da variância dos dados do subconjunto, respectivamente, e a soma de todas as PCs explica 62,50% da variância dos dados do subconjunto. As variáveis que mais contribuíram para a PC1 (Figuras 25a e 26a) foram Cla (25,26%), Clb (24,24%), pH (16,16%), SiO<sub>2</sub> (9,91%) e PTD (8,84%), as quais estão relacionadas positivamente, positivamente, positivamente, negativamente e positivamente a PC1, respectivamente. As variáveis que mais contribuíram para a PC2 (Figuras 25b e 26a) foram SiO<sub>2</sub> (19,90%), PI (15,16%), Turb (13,62%), NO<sub>3</sub> (11,78%), NO<sub>2</sub> (10,67%) e PT (8,87%), as quais estão positivamente relacionadas a PC2, respectivamente. As variáveis que mais contribuíram para a PC3 (Figuras 25c e 26b) foram OD (23,62%), PT (21,17%), NH<sub>4</sub> (18,68%), NO<sub>3</sub> (16,51%) e Turb (15,34%), as quais estão relacionadas negativamente, positivamente, positivamente, positivamente e negativamente a PC3, respectivamente. As variáveis que mais contribuíram para a PC4 (Figuras 25d e 26c) foram NO<sub>2</sub> (32,82%), NTK (21,69%), NO<sub>3</sub> (13,70%) e NH<sub>4</sub> (11,69%), as quais estão relacionadas positivamente, negativamente,

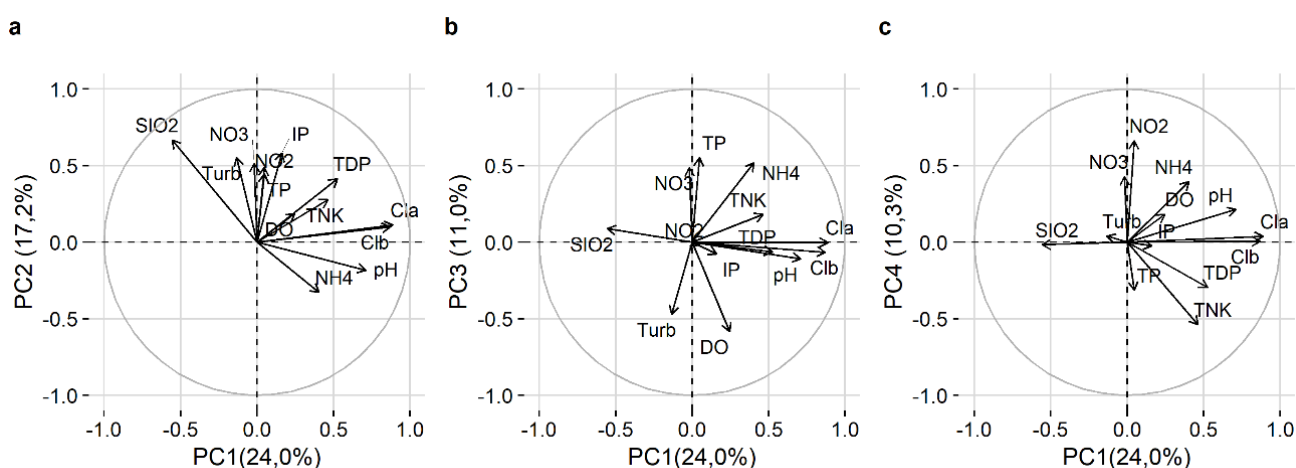
positivamente e positivamente a PC4, respectivamente. A Figura 27 mostra os padrões dos *scores* médios das PC1 (Figura 27a), PC2 (Figura 27b), PC3 (Figura 27c) e PC4 (Figura 27d) das variáveis limnológicas e nutrientes do subconjunto ao longo do tempo, agrupadas em tratamentos.



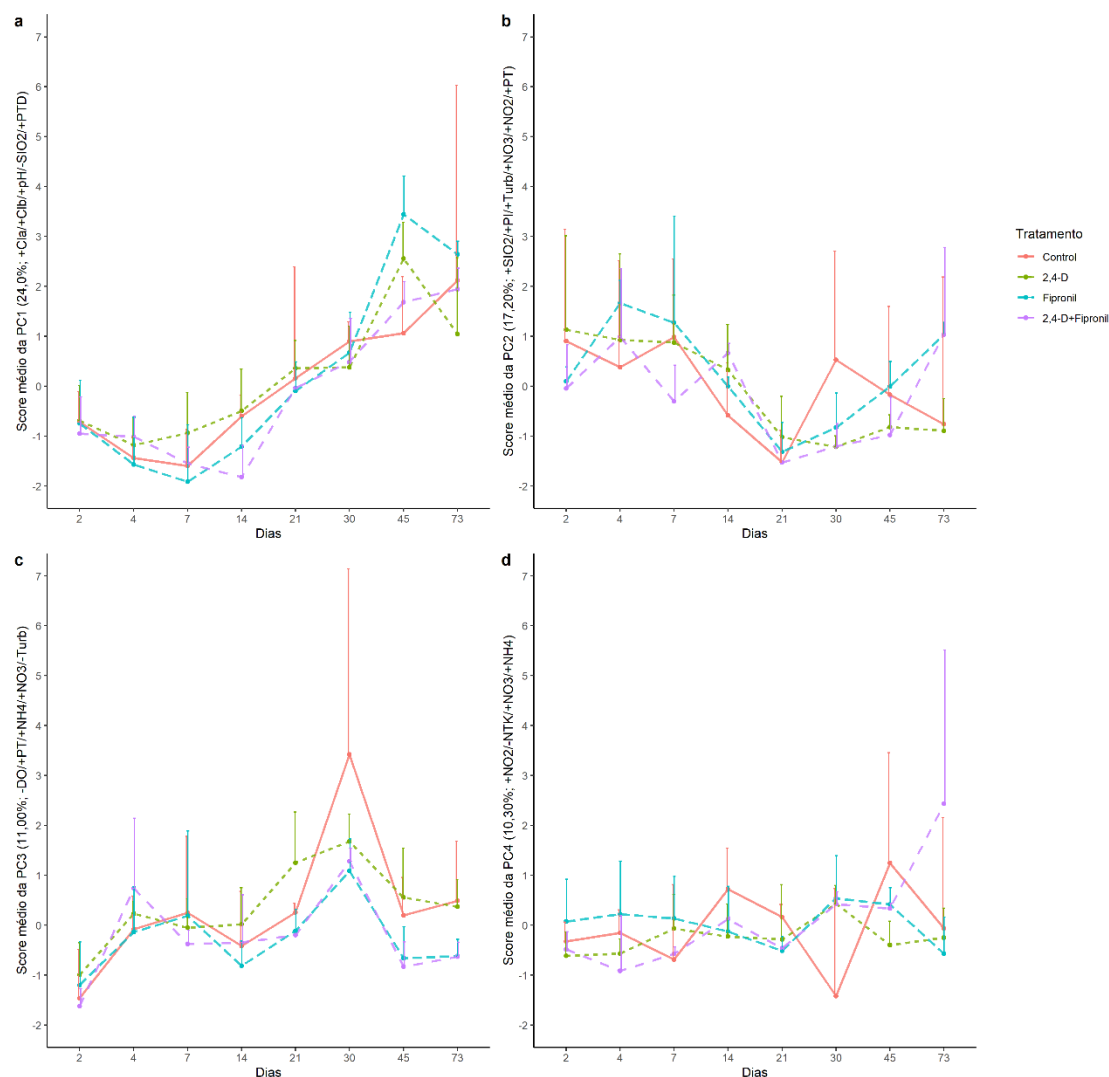
**Figura 24.** Análise *Parallel* da análise de componentes principais/ *principal components analysis* (PCA) do subconjunto de dados das variáveis físicas, químicas e nutrientes nos mesocosmos durante o experimento. Component number= número de componentes; valores eigen das componentes principais; PC actual data= dados atuais da PC; PC simulated data = dados simulados das PC; e PC resampled data= dados reamostrados da PC.



**Figura 25.** Contribuição das variáveis (%) da análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) para: **a)** componente principal/principal component (PC) 1; **b)** PC2; **c)** PC3; e **d)** PC4. Clb= clorofila b, Cla= clorofila a, pH= potencial de hidrogênio, OD= oxigênio dissolvido, Turb= turbidez, NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, PT= fósforo total, NO<sub>2</sub> = nitrito, PI= fosfato inorgânico, PTD= fosforo total dissolvido, NO<sub>3</sub>= nitrato, SIO<sub>2</sub>= silicato e NH<sub>4</sub>= íon amônio. As linhas pontilhadas vermelhas correspondem ao valor esperado caso a contribuição fosse uniforme. As contribuições acima da linha de referência podem ser consideradas como contribuições importantes para a PC.

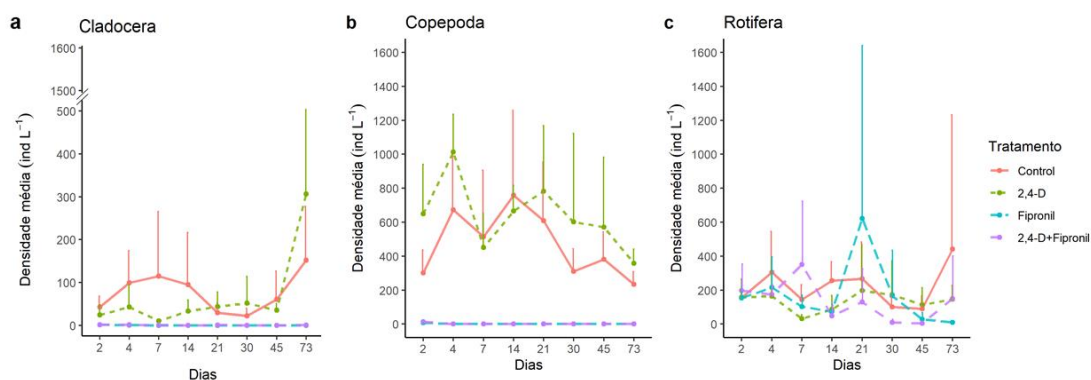


**Figura 26.** Análise de componentes principais/*principal component analysis* (PCA) das variáveis físicas, químicas e nutrientes e suas componentes principais/*principal component* (PC): **a)** PC1 versus PC2; **b)** PC1 versus PC3; e **c)** PC1 versus PC4. Clb= clorofila b, Cla= clorofila a, pH= potencial de hidrogênio, OD= oxigênio dissolvido, Turb= turbidez, NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, PT= fósforo total, NO<sub>2</sub> = nitrito, PI= fosfato inorgânico, PTD= fosforo total dissolvido, NO<sub>3</sub>= nitrato, SIO<sub>2</sub>= silicato e NH<sub>4</sub>= íon amônio. As flechas representam a magnitude e a direção da contribuição de cada uma das variáveis.



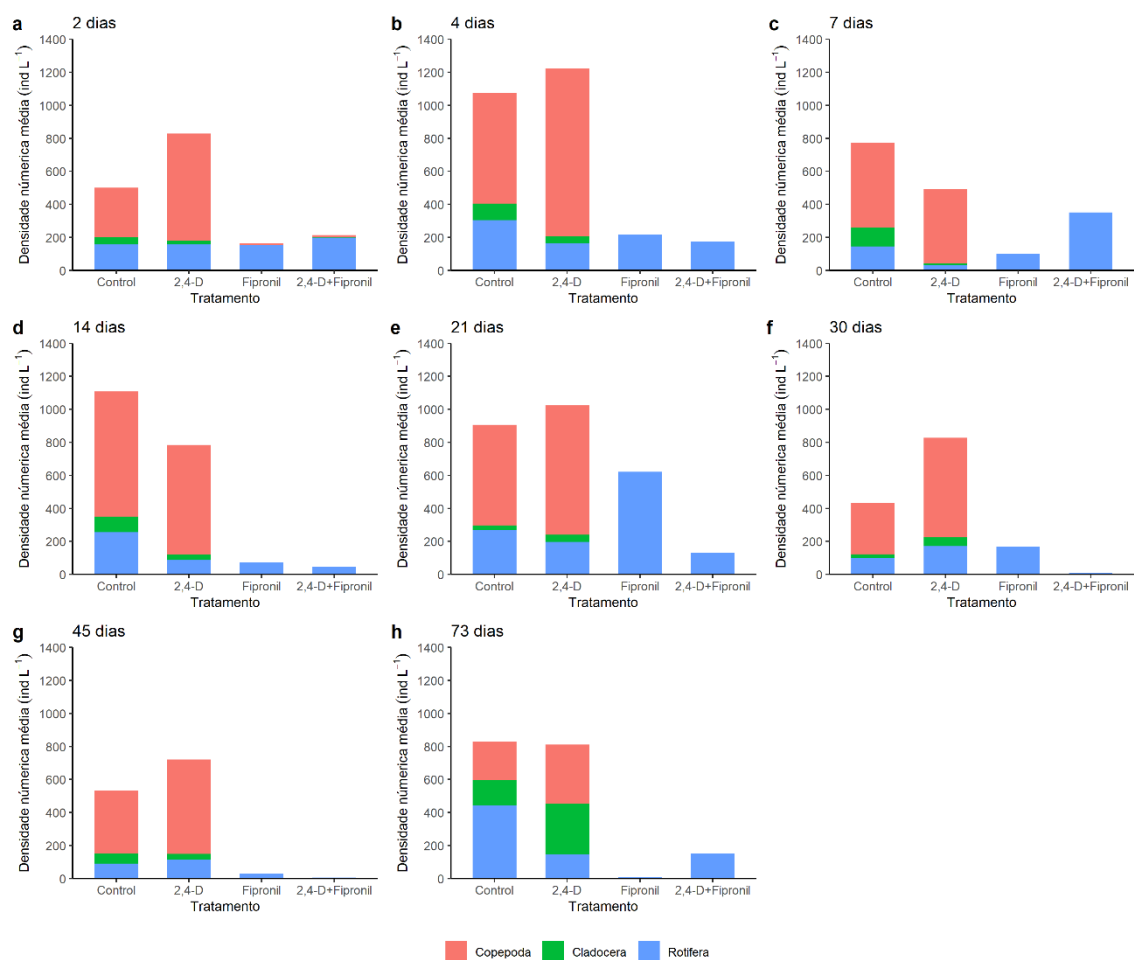
### 6.2.2 Efeito dos agrotóxicos na densidade de Cladocera, Copepoda e Rotífera

Os resultados das médias e desvios padrão da densidade de Cladocera, Copepoda e Rotífera ( $\text{ind L}^{-1}$ ) para os dias 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 nos tratamentos Controle, 2,4-D, Fipronil e 2,4-D+Fipronil estão descritos na Figura 28a, 28b e 28c, respectivamente.

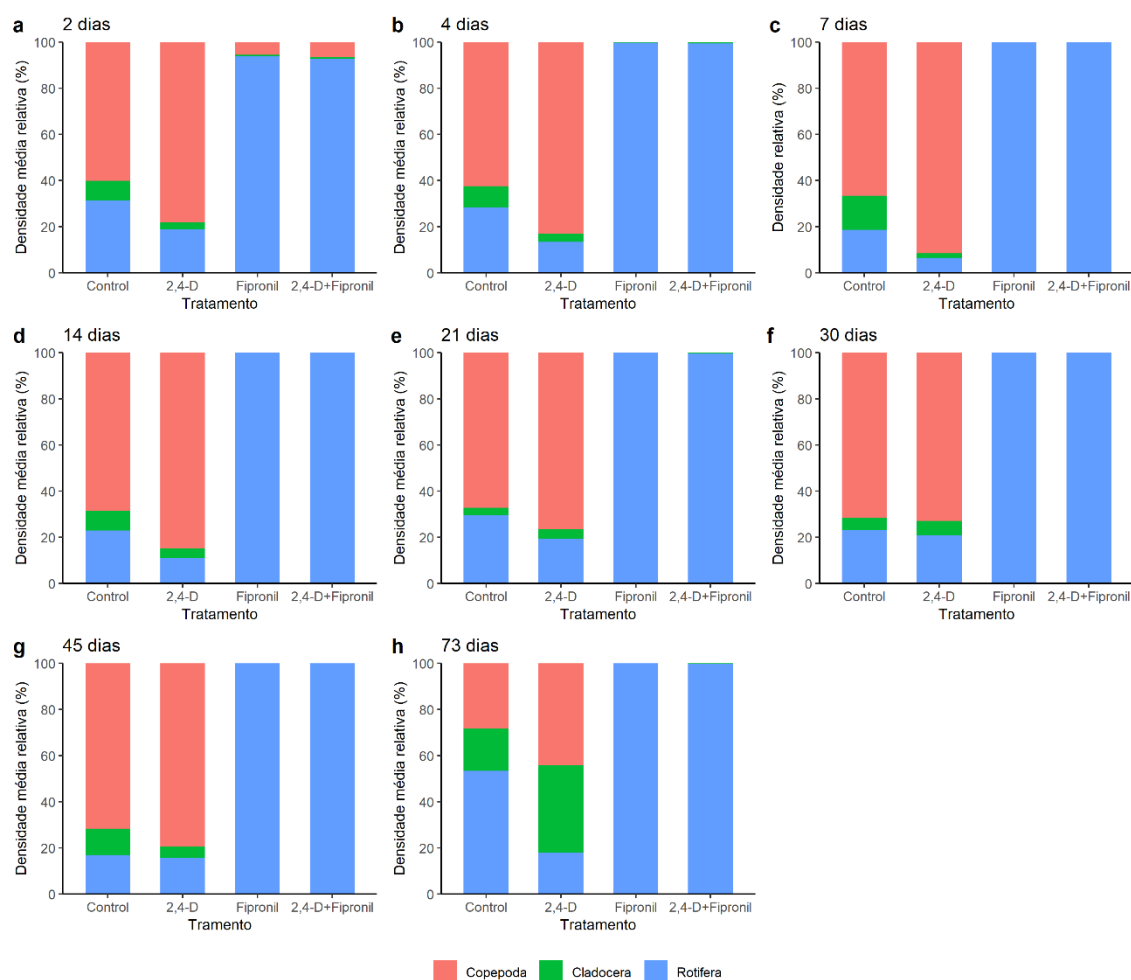


**Figura 28.** Densidade média ( $\text{ind L}^{-1}$ ) dos grandes grupos do zooplâncton ao longo do tempo: **a)** densidade de Cladocera; **b)** densidade de Copepoda; e **c)** densidade de Rotífera. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). As barras representam os valores médios “+” os desvios padrão. Control = tratamento controle.

Os resultados da densidade numérica ( $\text{ind L}^{-1}$ ) de Cladocera, Copepoda e Rotífera para os dias 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 nos tratamentos Controle, 2,4-D, Fipronil e 2,4-D+Fipronil estão apresentados na Figura 29, enquanto os resultados da densidade média relativa (%) dos grupos Cladocera, Copepoda e Rotífera para o mesmo período e mesmos tratamentos estão na Figura 30.



**Figura 29.** Densidade numérica (ind L<sup>-1</sup>) de Cladocera, Copepoda e Rotifera nos tratamentos Controle, 2,4-D, Fipronil e 2,4-D+Fipronil para os dias: **a)** 2; **b)** 4; **c)** 7; **d)** 14; **e)** 21; **f)** 30; **g)** 45; e **h)** 73. Os dias de coletas estão distribuídos referentes ao dia da contaminação (dia 0). Control = tratamento controle.



**Figura 30.** Densidade relativa (%) entre Cladocera, Copepoda e Rotífera nos tratamentos Controle, 2,4-D, Fipronil e 2,4-D+Fipronil para os dias: **a)** 2; **b)** 4; **c)** 7; **d)** 14; **e)** 21; **f)** 30; **g)** 45; e **h)** 73. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). Control = tratamento controle.

Nos tratamentos Fipronil e 2,4-D + Fipronil as médias de abundância de Cladocera (Figuras 28a, 29 e 30) e Copepoda (Figuras 28b, 29 e 30) diminuíram significativamente dois dias após a contaminação, e a partir de quatro dias após a contaminação até o final do experimento houve total mortalidade da população desses dois grupos devido ao efeito tóxico direto dos agrotóxicos nesses dois tratamentos. O tratamento 2,4-D demonstrou um efeito na densidade de Copepoda similar ao Controle ao longo do tempo. A densidade de Cladocera, comparada com os outros grupos no Controle, foi o grupo de menor representatividade, enquanto Copepoda foi o grupo de maior representatividade. Como muitos outros inseticidas, o fipronil atua no sistema nervoso dos organismos (COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993), enquanto o herbicida 2,4-D age sobre hormônios de crescimento de dicotiledôneas (SONG, 2014). Assim, o resultado de maior toxicidade em Cladocera e em Copepoda nos tratamentos contendo fipronil já era esperado. Resultados

similares para estes dois grupos foram apresentados por NOVELLI (2010) e RESENDE (2015) para o inseticida abamectina aplicado através da água do escoamento superficial/*runoff* e diretamente (respectivamente) em experimentos em mesocosmos com duração de 10 e 20 dias, respectivamente. Em relação ao tratamento 2,4-D, o resultado deste estudo para a abundância de Cladocera, Copepoda e Rotífera está alinhado com muitos outros estudos em mesocosmos, em que herbicidas não apresentaram efeitos tão severos e diretos (*i.e.* o letal) ao zooplâncton como outros agrotóxicos (GOLOMBIESKI *et al.*, 2008; RELYEA, 2005; RICO-MARTÍNEZ *et al.*, 2012). RELYA (2005) em um teste em mesocosmos também observou a ausência de impacto direto de 2,4-D a comunidade zooplânctonica durante 14 d.

O efeito negativo na abundância de Cladocera e Copepoda nos tratamentos contendo Fipronil (Fipronil e 2,4-D+Fipronil) e a ausência de efeito direto na abundância dos dois grupos no tratamento com 2,4-D isolado estão de acordo com os vários dados de  $CL_{50}$  de Fipronil e 2,4-D para espécies desses dois grupos. Neste estudo as concentrações nominais utilizadas nos mesocosmos com fipronil ( $64 \mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil) foram maiores que a maior parte das  $CL_{50}$  para espécies de Cladocera e Copepoda. Da mesma forma, as concentrações reais após 2 dias da contaminação para os mesocosmos contaminados com fipronil (**Fipronil:**  $13,77 \pm 1,14 \mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; e **2,4-D+Fipronil:**  $15,18 \pm 1,58 \mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil), foram maiores ou bastante próximas a maior parte das  $CL_{50}$  para espécies de Cladocera e Copepoda. Enquanto que para 2,4-D, tanto as concentrações nominais utilizadas nos mesocosmos ( $452 \mu\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D) quanto as concentrações reais quantificadas após 2 dias de contaminação nos mesocosmos contendo este agrotóxico 2,4-D (**2,4-D:**  $683,72 \pm 63,45 \mu\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D; e **2,4-D+Fipronil:**  $804,04 \pm 13,21 \mu\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D) foram menores que a  $CL_{50}$  de 2,4-D para espécies de Cladocera e Copepoda. Por exemplo, para os cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* Daday 1902, *C. dubia* Richard 1894 e *D. pulex* Leydig 1860, e para os copépodos *Diatomus cartor* Jurine 1820 e *Amphiascus tenuiremis* Brady 1880, as  $CL_{50}$  ao fipronil foram:  $3,90 \mu\text{g L}^{-1}$  (SILVA *et al.*, 2020);  $17,70 \mu\text{g L}^{-1}$  (KONWICK *et al.*, 2005);  $15,60 \mu\text{g L}^{-1}$  (STARK; VARGAS, 2005);  $3,45 \mu\text{g L}^{-1}$  (CHATON *et al.*, 2002); e  $6,80 \mu\text{g L}^{-1}$  (CHANDLER *et al.*, 2004), respectivamente. Para os valores das  $CL_{50}$  de 2,4-D às espécies de cladóceros *C. silvestrii*, *C. dubia* e *D. magna*, e as espécies de copépodos *Spicodiatomus chelospinus* Rajendran 1973 e *Eudiatomus gracilis* Sars 1863 foram:  $169,00 \text{ mg L}^{-1}$  (SILVA *et al.*, 2020);



236,00 mg L<sup>-1</sup> (ORIS; WINNER; MOORE, 1991); 36,40 mg L<sup>-1</sup> (ALEXANDER; GERSICH; MAYES, 1985); 1,85 mg L<sup>-1</sup> (US EPA, 2018); e 144,10 mg L<sup>-1</sup> (US EPA, 2018), respectivamente. A população de Rotífera (Figuras 28c, 29 e 30), nos tratamentos Fipronil e 2,4-D + Fipronil foi a única que manteve representatividade ao longo dos 73 d após a contaminação. Vários autores já demonstraram a maior tolerância de Rotífera aos agrotóxicos comparado a Cladocera e Copepoda (abamectina, metsulfuron-metilico, azimsulfuron, clorpirifós, terbutilazina, e carbofurano) (GOLOMBIESKI *et al.*, 2008; LOZANO *et al.*, 1992; NOVELLI, 2010; PEREIRA; CEREJEIRA; DAAM, 2017; RESENDE, 2015). Entretanto, PEREIRA, CEREJEIRA e DAAM (2017), observaram um efeito contrário, em que a população de Rotífera exposta à um tratamento com inseticida clorpirifós, foi extinta durante quatro dias após a aplicação desse agrotóxico.

Além disso, não se verificou a recuperação na densidade tanto de Cladocera e Copepoda após 73 d da contaminação nos tratamentos de Fipronil e 2,4-D+Fipronil. A persistência do efeito tóxico dos agrotóxicos nos mesocosmos pode ser explicada por alguns fatores como: *i*) o tempo de meia vida de Fipronil e 2,4-D na água, os quais são considerados altos (mais de 100 dias (BOBÉ *et al.*, 1998) e estável (US EPA, 1996), respectivamente (Tabela1)); *ii*) o retorno a coluna de água das frações desses agrotóxicos que já estavam no sedimento devido a ressuspensão do sedimento (nos dias 7 e 21 houve um aumento na concentração dos agrotóxicos no sistema, provavelmente devido a ressuspensão do sedimento dos mesocosmos), pois sabe-se que a ressuspensão do sedimento devido a turbulência pode aumentar as concentrações de contaminantes nos ecossistemas aquáticos (CIBIC *et al.*, 2016; JURADO *et al.*, 2007); e *iii*) os p.i. das formulações comerciais dos agrotóxicos, pois estas contem, além dos i.a., outros compostos com diferentes funções, e que geralmente não estão nas bulas/rótulos. Esses produtos são conhecidos como inertes, porque não são considerados tóxicos a biota (TOMINACK; TOMINACK, 2000). Porém, dentre as diversas funções desses p.i. uma delas é aumentar a solubilidade e a persistência dos agrotóxicos no ambiente, conseqüentemente aumentando o tempo de exposição dos organismos aquáticos aos mesmos (COX; SURGAN, 2006).

Os modelos completos das análises com GLMM com as distribuições Poisson e Binomial Negativa não convergiram para nenhuma das variáveis respostas (abundância de Cladocera, Copepoda e Rotífera), assim a distribuição Log gaussiana foi utilizada no

modelo linear misto (LMM). Em relação às análises estatísticas para a abundância de Cladocera, a importância da ordem dos efeitos das variáveis fixas no modelo foi testada utilizando o modelo linear (LM) e a ordem foi: tratamento (AICc – 311,20; grau de liberdade/*degree of freedom* (df) – 5); comunidade (AICc – 388,00; df – 3); PC3 (AICc – 445,50; df – 3); dias (AICc – 452,80; df – 3); PC1 (AICc – 453,50; df – 3); PC4 (AICc – 453,70; df – 3); e PC2 (AICc – 453,70; df – 3). Os efeitos aleatórios dos mesocosmos e dos dias, e os efeitos fixos dos tratamentos e da PC3 foram significativos na abundância de Cladocera (Tabela 2) (o diagnóstico dos resíduos do melhor modelo ajustado está no Apêndice B1). O processo detalhado da modelagem da significância dos efeitos das variáveis, começando pelo modelo completo ao modelo reduzido, com o melhor ajuste para a abundância de Cladocera, está no Apêndice B4.

**Tabela 2.** Resultados dos modelos lineares misto, linear e linear com variável resposta a abundância de Cladocera, de Copepoda e de Rotífera, respectivamente. AICc - critério de informação de Akaike/ *Akaike information criterion* corrigido para amostras-pequenas;  $\Delta$ AICc – diferença entre o AICcs do modelo com o melhor ajuste e demais modelos; df- graus de liberdade/*degree of freedom*; m – modelo. O modelo com menor AICc e melhor ajuste está destacado em vermelho.

Variável resposta	Modelo	AICc	$\Delta$ AICc	Df
Cladocera	<b>m14</b>	<b>293,30</b>	<b>0,00</b>	<b>8</b>
	m12	295,30	2,00	9
	m13	298,50	5,20	8
	m11	304,10	10,80	10
	m10	308,50	15,20	11
	m9	313,40	20,10	12
	m15	315,90	22,60	5
	m7	316,80	23,50	16
	m8	317,70	24,50	13
	m6	328,90	35,60	19
	m5	332,10	38,90	22
	m4	346,40	53,10	25
	m3	356,80	63,50	28
	m completo	358,40	65,10	31
	m1	370,10	76,80	30
m2	371,20	77,90	30	
Variável resposta	Modelo	AICc	$\Delta$ AICc	df
Copepoda	<b>m10</b>	<b>204,60</b>	<b>0,00</b>	<b>13</b>
	m8	207,10	2,50	14

	m11	207,90	3,30	12
	m13	209,40	4,80	12
	m6	209,90	5,30	17
	m9	212,90	8,20	13
	m5	216,20	11,60	20
	m7	222,10	17,40	14
	m4	224,50	19,90	23
	m12	226,90	22,20	12
	m3	233,40	28,80	26
	m2	239,40	34,70	29
	m1	343,00	138,40	30
	m completo	345,60	140,90	31
<b>Variável resposta</b>	<b>Modelo</b>	<b>AICc</b>	<b><math>\Delta</math>AICc</b>	<b>df</b>
	<b>m10</b>	<b>374,60</b>	<b>0,00</b>	<b>9</b>
	m12	375,30	0,70	8
	m9	376,90	2,30	10
	m13	377,70	3,10	5
	m8	379,00	4,40	11
	m7	379,50	4,90	14
	m11	382,50	7,90	8
	m14	382,50	7,90	7
Rotífera	m6	387,50	12,90	17
	m4	394,10	19,50	23
	m5	394,10	19,50	20
	m15	395,40	20,80	7
	m3	397,30	22,70	26
	m2	400,50	25,90	29
	m1	457,00	82,40	30
	m completo	459,00	84,40	31

A abundância de Cladocera nos tratamentos Fipronil e 2,4-D+Fipronil diminuiu significativamente comparada com o Controle (Tabela 3a). O efeito do tratamento 2,4-D diminuiu a abundância dos organismos, mas não significativamente (Tabela 3a). O efeito da PC3 aumentou significativamente a abundância de Cladocera (Tabela 3a). A PC3 do subconjunto está relacionada com os processos de aumento da difusão de OD devido a ação do vento/turbulência e da turbidez devido a ressuspensão de sedimento (SCHEFFER, 2004) no dia 2. O aumento de OD e turbidez a partir do dia 45 é devido ao

aumento de fitoplâncton (KALAJI *et al.*, 2014; WETZEL, 2001). O aumento de nutrientes explicado pela PC3 é devido aos processos: *i*) de decomposição; *ii*) da produção e do consumo do OD; *iii*) e das mudanças dos níveis de OD nos mesocosmos, as quais influenciam na disponibilidade ou/e imobilização de formas de fósforo na coluna de água, como também na nitrificação/desnitrificação de formas do nitrogênio. As condições do ambiente relacionadas à PC3, como elevadas concentrações de nutrientes, altos níveis de material em suspensão (alta turbidez) e também alta biomassa fitoplanctônica favorecem cladóceros de maior porte, com hábito herbívoro raspador, ou seja, que tem como fonte de alimento fitoplâncton de maior tamanho, partículas aderidas ao sedimento (CASTILHO, 2018) e/ou em algum substrato como as macrófitas (BARNETT; FINLAY; BEISNER, 2007; CASTILHO, 2018), assim aumentando a abundância do grupo Cladocera.

Os efeitos aleatórios dos mesocosmos e dias explicaram 32,45% e 18,82% da variância da abundância de Cladocera, respectivamente (*i.e.* a variância da abundância no modelo entre as réplicas dos mesocosmos e também ao longo do tempo). A comunidade zooplanctônica contém uma dinâmica populacional inerente que varia ao longo do tempo, devido a mudanças ecológicas relacionadas a fatores bióticos e abióticos (BEISNER; PERES-NETO, 2009; WETZEL, 2001). Em relação à variação entre as réplicas dos mesocosmos uma discussão mais aprofundada sobre esse tema será apresentada a seguir neste capítulo, na seção 6.2.3.

**Tabela 3.** Valores do coeficiente da estimativa, erro padrão (E.P.), *t*-valor e *p*-valor para os efeitos fixos dos modelos Linear misto, Linear e Linear com abundância de **a)** Cladocera, **b)** Copepoda e **c)** Rotifera como resposta, respectivamente. “\*” = interação.

a)	Variável fixa	Estimativa	E.P.	<i>t</i> -valor	<i>p</i> -valor
	Tratamento Controle (Intercepto)	3,63	0,34	10,74	4,70 x 10 <sup>-7</sup>
	Tratamento 2,4-D	-0,28	0,48	-0,58	5,73 x 10 <sup>-1</sup>
	Tratamento Fipronil	-3,42	0,48	-7,08	2,41 x 10 <sup>-5</sup>
	Tratamento 2,4-D+Fipronil	-3,32	0,48	-6,85	3,23 x 10 <sup>-5</sup>
	PC3	0,29	0,08	3,51	5,13 x 10 <sup>-3</sup>
b)	Variável fixa	Estimativa	E.P.	<i>t</i> -valor	<i>p</i> -valor
	Tratamento Controle (Intercepto)	5,82	0,26	22,60	<2,00 x 10 <sup>-16</sup>
	Tratamento 2,4-D	0,40	0,16	2,46	1,55 x 10 <sup>-2</sup>
	Tratamento Fipronil	-5,75	0,17	-34,36	<2,00 x 10 <sup>-16</sup>
	Tratamento 2,4-D+Fipronil	-5,48	0,18	-30,25	<2,00 x 10 <sup>-16</sup>
	Comunidade	0,11	0,04	2,61	1,05 x 10 <sup>-2</sup>
	PC3	0,15	0,07	2,30	2,36 x 10 <sup>-2</sup>
	Dias	-0,02	0,00	-4,98	2,84 x 10 <sup>-6</sup>
	PC4	0,12	0,05	2,31	2,29 x 10 <sup>-2</sup>
	PC1	0,15	0,05	2,98	3,69 x 10 <sup>-3</sup>
	Tratamento 2,4-D * PC3	-0,05	0,14	-0,39	6,98 x 10 <sup>-1</sup>
	Tratamento Fipronil * PC3	-0,44	0,14	-3,09	2,65 x 10 <sup>-3</sup>
	Tratamento 2,4-D+Fipronil * PC3	-0,55	0,14	-3,95	1,49 x 10 <sup>-4</sup>
c)	Variável fixa	Estimativa	E.P.	<i>t</i> -valor	<i>p</i> -valor
	Tratamento Controle (Intercepto)	1,48	1,16	1,28	2,05 x 10 <sup>-1</sup>
	PC1	-0,36	0,07	-4,84	4,81 x 10 <sup>-6</sup>
	Comunidade	0,57	0,18	3,06	2,88 x 10 <sup>-3</sup>
	Tratamento 2,4-D	-0,78	0,36	-2,17	3,21 x 10 <sup>-2</sup>
	Tratamento Fipronil	2,23	1,14	1,95	5,42 x 10 <sup>-2</sup>
	Tratamento 2,4-D+Fipronil	1,64	1,10	1,49	1,40 x 10 <sup>-1</sup>
	PC4	-0,31	0,11	-2,72	7,77 x 10 <sup>-3</sup>

Em relação às análises estatísticas para a abundância de Copepoda, a importância da ordem dos efeitos das variáveis fixas no modelo foram testadas utilizando o LM e a ordem foi: tratamento (AICc – 234,10; df – 5); comunidade (AICc – 516,20; df – 3); PC3 (AICc – 541,30; df – 3); dias (AICc – 543,80; df – 3); PC4 (AICc – 544,10; df – 3); PC2 (AICc – 544,40; df – 3); e PC1 (AICc – 544,40; df – 3). Os efeitos aleatórios dos dias e dos mesocosmos não foram significativos na variância da abundância de Copepoda, assim o LM foi aplicado. Os efeitos fixos dos tratamentos, da comunidade, da PC3, dos dias, da PC4, da PC1 e a da interação entre tratamento\*PC3 foram significativos na abundância

de Copepoda (Apêndice B4) (o diagnóstico dos resíduos do melhor modelo ajustado está no Apêndice B2). O processo detalhado da modelagem da significância dos efeitos das variáveis, começando pelo modelo completo ao modelo reduzido, com o melhor ajuste para a abundância de Copepoda, está no Apêndice B4. A abundância de Copepoda no tratamento 2,4-D aumentou significativamente, comparado com o Controle (Tabela 3b). Entretanto, os efeitos dos tratamentos Fipronil e 2,4-D+Fipronil diminuíram significativamente a abundância de Copepoda em relação ao Controle (Tabela 3b). Os efeitos da comunidade, da PC3, da PC4 e da PC1 aumentaram significativamente a abundância de Copepoda ((Tabela 3b). A abundância dos organismos reduziu significativamente devido ao efeito fixo dos dias (Tabela 3b). O efeito da interação entre o tratamento 2,4-D\*PC3 diminuiu a abundância de Copepoda em relação à interação Controle\*PC3, mas não significativamente (Tabela 3b). Entretanto, os efeitos das interações entre o tratamento Fipronil\*PC3 e entre o tratamento 2,4-D+Fipronil\*PC3 reduziram significativamente a abundância de Copepoda comparados com a interação entre Controle\*PC3 (Tabela 3b).

O aumento da abundância de Copepoda no tratamento 2,4-D em relação ao Controle pode ser explicado por efeitos indiretos, como por exemplo a diminuição da abundância de cladóceros herbívoros (a abundância de Cladocera diminuiu nesse tratamento em relação ao Controle, mas não significativamente), diminuindo a competição por recursos entre esses dois grupos. Silva *et al.* (2020) relataram que em testes crônicos com *C. silvestrii* (herbívoros) houve a diminuição na reprodução e uma grande inibição da reprodução em concentrações de 60, 70 e 80 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, corroborando com informações na bibliografia do efeito de herbicidas como desreguladores endócrinos à espécie do zooplâncton (RICO-MARTÍNEZ *et al.*, 2012). Outro fator em conjunto com a diminuição da competição com Cladocera pode ser o aumento da clorofila nos mesocosmos com 2,4-D, em que a biomassa fitoplânctônica foi controlada e mantida ao mesmo nível do Controle devido ao aumento da densidade de Copepoda e conseqüentemente o consumo das microalgas. Este fenômeno foi descrito em mesocosmos contaminados com os herbicidas propanil (PERSCHBACHER; LUDWIG; SLATON, 2002) e diuron (PERSCHBACHER; LUDWIG, 2004), dando destaque ao diuron, que estimulou o crescimento principalmente de algas verdes e de diatomáceas (PERSCHBACHER; LUDWIG, 2004).

Em relação ao aumento da abundância de Copepoda devido ao efeito da comunidade, o mesmo pode ser explicado pela diversidade de hábitos alimentares e níveis tróficos dentro desse grupo e de seus estágios de desenvolvimento, o que permite que eles ocupem vários nichos ecológicos (ESTEVES, 1998). Os estágios naupliares se alimentam desde fitoplâncton (VOGT *et al.*, 2013) até microozoplâncton, bactérias e detritos (HEINLE *et al.*, 1977). Os adultos de Calanoida se alimentam principalmente de fitoplâncton e eventualmente de bactérias e detritos (ESTEVES, 1998) e os adultos de Cyclopoida são preferencialmente carnívoros (NEVES *et al.*, 2003), podendo se alimentar de microcrustáceos, larvas de insetos, etc. (ESTEVES, 1998) e podem ser onívoros (DA SILVA, 2015).

Tanto a PC1 quanto a PC3 e a PC4 estão favorecendo o aumento da abundância de Copepoda por meio de processos que beneficiam o crescimento do fitoplâncton e a decomposição e disponibilidade de matéria orgânica para os copépodos onívoros. A PC1 está relacionada diretamente com o aumento de Cla e Clb, com os processos de fotossíntese e com a competição entre SiO<sub>2</sub> e PTD, os quais já foram explicados no capítulo 1. Com o aumento da competição entre SiO<sub>2</sub> e PTD no sedimento haverá a liberação de PTD para coluna de água, que é um nutriente importante para a fotossíntese (SCHEFFER, 2004). O aumento da abundância de copépodos devido ao efeito da PC3, como já foi explicado anteriormente, vem dos processos de decomposição e fotossíntese, além do efeito do vento. Esses processos aumentam a disponibilidade de nutrientes (para a fotossíntese), material em suspensão (turbidez) e do OD pelo aumento da fotossíntese. Ainda, como para grandes cladóceros herbívoros raspadores, os copépodos Cyclopoida são correlacionados positivamente com águas turvas, material em suspensão, nutrientes e Cla. Os copépodos onívoros em águas turvas podem se beneficiar tanto do consumo das algas como da matéria orgânica disponível, enquanto os herbívoros são mais beneficiados em águas claras, onde consomem preferencialmente o fitoplâncton (CASTILHO, 2018). A PC4 está relacionada com os processos de amonificação e nitrificação/desnitrificação, ou seja, a transformação de nitrogênio orgânico sequencialmente em NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub> (ESTEVES, 1998; WETZEL, 2001). A PC4 indiretamente colabora com o aumento da abundância de copépodos, pois os organismos fotossintetizantes tem como preferência as formas nitrogenadas de NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub> (CEDERGREEN; MADSEN, 2002; WETZEL,

2001), conseqüentemente o aumento na disponibilidade desses compostos favorecerem a assimilação e o crescimento da biomassa fitoplânctônica.

Vale ressaltar que as macrófitas presentes nos mesocosmos podem ter contribuído para os processos de fotossíntese descritos pela PC1, PC3 e PC4. Além disso, macrófitas aquáticas de ambientes tropicais e subtropicais criam micro-habitat para assembleias de macroinvertebrados, os quais se alimentam/predam os organismos zooplânctônicos, assim, dependendo do tamanho da comunidade de macroinvertebrados, espécies mais vulneráveis de cladóceros e de copépodos Calanoida correm um maior risco de predação por esses organismos (SAGRARIO *et al.*, 2009). Por outro lado, os copépodos Cyclopoida se beneficiam também desses micro-habitats para se protegerem e se alimentarem (SAGRARIO *et al.*, 2009). Entretanto, nas nossas análises estatísticas nós apenas consideramos, dentro do efeito da comunidade, a abundância dos próprios organismos zooplânctônicos aqui analisados, porém a predação sobre a comunidade do zooplâncton por macroinvertebrados pode ser um outro fator que explique a variância não explicada pelos modelos na abundância de Cladocera e Copepoda.

A redução da densidade de copépodos devido ao efeito da interação entre os tratamentos com agrotóxicos e a PC3 (em que o efeito foi significativo para as interações entre Fipronil\*PC3 e 2,4-D+Fipronil\*PC3), aumenta a preocupação em relação a respostas sinérgicas causadas devido as interações de agrotóxicos com outros componentes químicos e com fatores abióticos à comunidade aquática. Diferente das condições de laboratório, no ambiente natural os organismos aquáticos estão expostos a uma variedade de estressores naturais, além de uma mistura de uma diversidade de compostos, inclusive agrotóxicos, por esses motivos os organismos no ambiente são considerados mais sensíveis (HANAZATO, 2001; HÉBERT *et al.*, 2021; JACKSON *et al.*, 2016; LUGO *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2018). Neste estudo, provavelmente os agrotóxicos interagiram com os valores baixos de OD (a variável que mais contribui para a PC3) e também com as mudanças diárias dessa variável, a qual pode alcançar valores de anóxia durante a noite (ESTEVES, 1998; US EPA, 2022a; WETZEL, 2001). DANTAS *et al.* (2009) mostraram que Copepoda foi o grupo do zooplâncton mais impactado devido à depleção do OD em um reservatório do Nordeste Brasileiro. Ainda, segundo HANAZATO (2001), estressores naturais como predação, falta de alimento, deficiência de oxigênio e altas temperaturas podem modificar a sensibilidade dos



organismos a toxicidade dos agrotóxicos, já que estes organismos estarão mais estressados e vulneráveis aos efeitos tóxicos dos contaminantes.

O efeito fixo dos dias diminuiu a abundância da população de copépodos e isto pode estar relacionado com mudanças das características físicas e químicas da água ao longo do tempo devido a sazonalidade e também a remoção das macrófitas ao longo do experimento, favorecendo algumas espécies do zooplâncton em detrimento de outras. Alterações sazonais nas variáveis limnológicas são características de ambientes lênticos tropicais e tem grande influência na dinâmica da comunidade zooplancônica (CASTILHO, 2018), como já foi discutido anteriormente que águas turvas favorecem espécies de Cyclopoida e grandes cladóceros herbívoros raspadores e águas claras as espécies de organismos herbívoros. Outra evidência sobre o efeito temporal nos copépodos é o padrão similar da variação média da abundância desses organismos ao longo do tempo entre os mesocosmos de 2,4-D e Controle. Existe um fenômeno chamado “coerência temporal” que retrata a sincronia na flutuação temporal da densidade de populações em diferentes locais (LANSAC-TÔHA *et al.*, 2008). Um dos fatores que pode ter efeito sobre a sincronia/similaridade entre as populações é o fator regional (efeito Moran), como o clima, por exemplo, que interfere em toda a região (LANSAC-TÔHA *et al.*, 2008). Em relação ao efeito da remoção das macrófitas, CASTILHO (2018) observou que nos períodos em que as macrófitas se tornaram ausentes, espécies que se utilizavam delas como abrigo ou fonte de alimento foram substituídas por espécies pelágicas. Além disso, vale ressaltar que as espécies de copépodos apresentam um ciclo de vida mais longo em relação aos cladóceros e rotíferos (ESTEVES, 1998) e embora as espécies de Calanoida sejam sensíveis a variações ambientais (MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2003), talvez o longo ciclo de vida de copépodos em relação aos cladóceros e rotíferos, faz com que as respostas das populações de copépodos às variações ambientais sejam relativamente mais demoradas que desses outros dois grupos. Esta hipótese pode ser também outra variável que contribuiu para o efeito fixo do tempo ser significativo na abundância de Copepoda, e não para Cladocera e Rotífera. A espécie Calanoida *N. iheringi* tem o tempo de desenvolvimento de ovo à ovo de 13,39 d e longevidade de 61,61 d à 26 °C (RIETZLER; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2002) e a espécie Cyclopoida *Ectocyclops herbsti* Dussart 1984 tem o tempo de desenvolvimento de ovo à ovo de 18,00 ±0,70 d e longevidade média em laboratório de 50,43± 20,73 d à 25 °C

(DUARTE, 2016). O cladóceros da espécie *C. silvestrii* tem o tempo de desenvolvimento de neonato à primípara de 3 à 4 d e longevidade de 29,80 d à 25 °C (FONSECA; ROCHA, 2004), enquanto a espécie de Rotífera Bdelloidea *Philodina roseola* Ehrenberg 1830 tem o tempo de desenvolvimento embrionário à primípara de 4,49 d e a longevidade máxima de 23,00 d à 25 °C (MOREIRA; MANSANO; ROCHA, 2016).

Em relação as análises estatísticas para a abundância de Rotífera, a importância da ordem dos efeitos das variáveis fixas no modelo foram testados utilizando o LM e a ordem foi: PC1 (AICc – 398,40; df – 5); comunidade (AICc – 400,90; df – 3); tratamento (AICc – 406,50; df – 3); dias (AICc – 408,20; df – 3); PC4 (AICc – 413,30; df – 3); PC3 (AICc – 416,80; df – 3); e PC2 (AICc – 417,70; df – 3). Os efeitos aleatórios dos mesocosmos e dos dias não foram significativos na variância da abundância de Rotífera, assim o LM foi aplicado. Os efeitos fixos dos tratamentos, da PC1, da comunidade e da PC4 foram significativos na abundância de Rotífera (Tabela 2) (o diagnóstico dos resíduos do melhor modelo ajustado está no Apêndice B3). O processo detalhado da modelagem da significância dos efeitos das variáveis, começando pelo modelo completo ao modelo reduzido, com o melhor ajuste para a abundância de Rotífera está no Apêndice B4. A abundância de Rotífera reduziu significativamente devido ao efeito da PC1 (Tabela 3c). O efeito da comunidade aumentou significativamente a abundância de Rotífera (Tabela 3c). A abundância de Rotífera diminuiu significativamente devido ao efeito do tratamento 2,4-D comparado ao Controle (Tabela 3c). Por outro lado, a abundância desse grupo aumentou, mas não significativamente, por causa do efeito dos tratamentos Fipronil e 2,4-D+Fipronil em relação ao tratamento Controle (Tabela 3c). O efeito da PC4 diminuiu significativamente a abundância de Rotífera (Tabela 3c).

A PC1 está relacionada com o aumento da biomassa fitoplanctônica e o aumento do pH no ambiente. Por ser um filo, Rotífera apresenta muitas espécies de organismos com uma variedade de hábitos alimentares podendo ser onívoros, carnívoros e herbívoros (ESTEVES, 1998) e se alimentarem de bactéria e detritos (BONECKER; AOYAGUI, 2005; STARKWEATHER; GILBERT; FROST, 1979). A diminuição da abundância de rotíferos devido ao efeito da PC1 pode ser reflexo da competição pelo alimento, em que rotíferos saem em desvantagem. Sabe-se que Rotífera não são filtradores eficientes e quando na presença de grandes cladóceros herbívoros podem sofrer uma diminuição na abundância da sua população, devido a competição por alimento (GILBERT, 1985,

1988). Além disso, nos mesocosmos do presente estudo a existência de copépodos herbívoros, como os calanoidas, os quais também competem pelos mesmos recursos que rotíferos e cladóceros, deve ser considerada. Outro motivo em que os copépodos podem ser os maiores competidores em relação a rotíferos em nosso experimento se deve ao fato de que o efeito da PC1 aumentou significativamente a abundância de Copepoda, enquanto o efeito da PC1 não foi significativo nas análises de abundância de Cladocera. A diminuição da densidade de Rotífera devido ao efeito da PC4 provavelmente se deve a dois fatores, pois como já foi mencionado anteriormente a PC4 está relacionada aos processos de amonificação e nitrificação/desnitrificação. Neste processo, devido ao OD baixo há a predominância das formas de  $\text{NH}_4$  e  $\text{NO}_2$  (WETZEL, 2001), sendo essa última forma a que mais contribuiu para a PC4. Segundo ROMBAUT *et al.* (2003) estas duas formas de nitrogênio, devido a uma baixa eficiência na nitrificação, são responsáveis por causarem impactos negativos na população de rotíferos. Além disso, há rotíferos que se alimentam de bactérias nitrificantes (LEE; OLESZKIEWICZ, 2003), o que pode ser um fator que tenha colaborado para a diminuição da eficiência da nitrificação no sistema, junto com os valores baixos de OD, aumentando assim a quantidade das formas prejudiciais aos rotíferos. Porém, trabalhos em relação aos fungos e bactérias aquáticas expostas a fipronil e 2,4-D, isolados e em mistura, precisam ser realizados para que o processo citado acima seja melhor explicado e comprovado.

Em contrapartida, o efeito da comunidade aumentou significativamente a abundância de Rotífera, o que pode estar relacionado com o aumento da turbidez durante um período do experimento, com ressuspensão de matéria orgânica, detrito e nutrientes, além do experimento ter sido caracterizado por valores baixos de OD. Os rotíferos são organismos oportunistas e bastante tolerantes fisiologicamente e ecologicamente a grandes variações ambientais (condições com baixo OD, ambientes eutrofizados, altas concentrações de detritos) como, por exemplo, condições abióticas desfavoráveis as copépodos Calanoida e aos cladóceros (CASTILHO, 2018; DANTAS *et al.*, 2009; ESPÍNDOLA *et al.*, 2000). Esses fatores podem ter favorecido as espécies de rotíferos mais tolerantes a essas variáveis. Segundo CASTILHO (2018) muitas espécies de rotíferos mostraram correlação positiva com a cobertura de macrófitas, nutrientes totais e material em suspensão, ou seja, em águas com maior turbidez.

Testes em laboratório com o herbicida 2,4-D com as espécies *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766 apresentaram um  $CE_{50}$  na reprodução no valor de  $128 \text{ mg L}^{-1}$  (i.a.) (SNELL; MOFFAT, 1992) e uma  $CL_{50-24h}$  de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (GEORGE; HINGORANI; RAO, 1982). SARMA *et al.* (2001) evidenciaram a importância da alimentação em testes de toxicidade com 2,4-D com a espécie de rotífero *B. patulus* Müller 1786. O autor demonstrou a redução da densidade desses organismos (alimentados) de  $\sim 500 \text{ ind mL}^{-1}$  no controle, para  $\sim 50 \text{ ind mL}^{-1}$  no tratamento com  $200 \text{ mg L}^{-1}$  do i.a. 2,4-D e para  $\sim 0 \text{ ind mL}^{-1}$  no tratamento com  $300 \text{ mg L}^{-1}$  do i.a. 2,4-D. Em relação à redução da taxa de crescimento SARMA *et al.* (2001) mostrou para a mesma espécie uma redução de  $0,50 \text{ ind d}^{-1}$  no controle, para  $0,10 \text{ ind d}^{-1}$  no tratamento com  $200 \text{ mg L}^{-1}$  do i.a. 2,4-D e para uma taxa negativa na concentração de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ . O herbicida 2,4-D tem a tendência de se acumular nas algas conforme o tempo e podem passar para os níveis tróficos superiores, podendo afetar indiretamente, por via das algas, e também diretamente através da desregulação endócrina de espécies mais sensíveis de rotíferos (SARMA *et al.*, 2001). Além disso, a interação do herbicida 2,4-D com a densidade de algas é considerado um fator importante na sobrevivência dos rotíferos (SARMA *et al.*, 2001). Assim, a diminuição da população de Rotífera no tratamento com 2,4-D pode ser explicada devido aos fatores como: *i*) variação da biomassa fitoplânctonica; *ii*) competição pelo fitoplâncton com outros herbívoros como cladóceros e copépodos; e *iii*) as espécies de rotíferos que podem ser sensíveis ao 2,4-D. Outros agrotóxicos como o herbicida glifosato isolado e em mistura com o inseticida imidacloprida, apresentaram efeitos tóxicos severos em populações de rotíferos em experimentos em mesocosmos (HÉBERT *et al.*, 2021). O aumento da abundância de Rotífera nos tratamentos com Fipronil e 2,4-D+Fipronil foi devido a supressão de Copepoda e Cladocera. Esse efeito foi observado também por RESENDE (2015) em experimentos em mesocosmos com abamectina.

### **6.2.3 Variação na densidade dos organismos entre réplicas em experimentos com mesocosmos**

Experimentos em modelos ecossistêmicos apresentam um baixo número de réplica, pois são experimentos bastante complexos, demandando um alto custo financeiro e de trabalho (KNAUER *et al.*, 2005; RESENDE, 2015). Consequentemente, a grande

variabilidade das respostas biológicas entre as réplicas dos mesocosmos (KNAUER *et al.*, 2005) é um dos maiores desafios nos experimentos ecossistêmicos, pois ela diminui a probabilidade de detectar mudanças e efeitos devido a perturbações/distúrbios/contaminação (KRAUFVELIN, 1998; RESENDE, 2015; SCHMITT-JANSEN *et al.*, 2008). Entretanto, isto não diminui a importância desses estudos, já que essa abordagem traz uma maior relevância ecológica, permitindo avaliar diversos efeitos em níveis de população e comunidade; indiretos como cascatas tróficas; de recuperação (*i.e.* tempo) do sistema ao impacto; e nas interações estruturais e funcionais (KNAUER *et al.*, 2005; RESENDE, 2015; SANDERSON, 2002). Alguns autores sugeriram o C.V. como uma forma de mensurar o grau de replicabilidade de estudos em mesocosmos (ISENSEE, 1976; KRAUFVELIN, 1998; RESENDE, 2015; SANDERSON, 2002), porém para avaliações de efeitos em nível de população e comunidade há uma grande variabilidade do C.V. (entre 0 e 200%) (KRAUFVELIN, 1998), devido a variabilidade temporal e espacial inerente do próprio sistema (KNAUER *et al.*, 2005; KRAUFVELIN, 1998; SANDERSON, 2002; SANDERSON *et al.*, 2009). Neste estudo, os valores de C.V. (%) da densidade de Cladocera, Copepoda e Rotífera para os dias 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 e 73 dos tratamentos Controle, 2,4-D, Fipronil e 2,4-D+Fipronil estão nas Figuras 31a, 31b, 31c e 31d, respectivamente, e esses resultados corroboram com a afirmação de grande variabilidade entre réplicas ao longo do tempo.

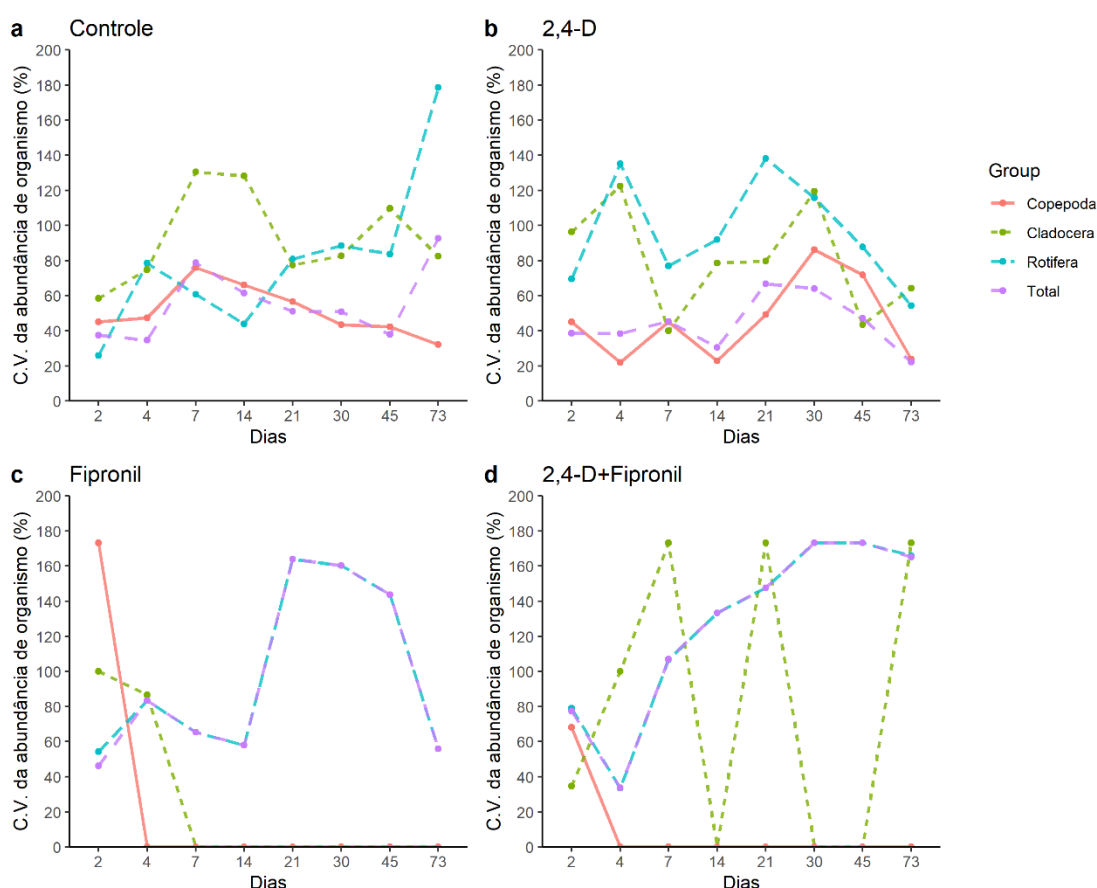
No presente estudo foram utilizados os modelos GLMM para as análises estatísticas, já que eles permitem a inclusão de fatores aleatórios para a estimativa da variabilidade da abundância da população de organismos ao longo dos dias e entre os mesocosmos (BOLKER *et al.*, 2009; RICHARDSON *et al.*, 2019). Segundo BOLKER *et al.* (2009) os fatores aleatórios (*random effects*) são fatores cujos níveis são amostrados de uma população maior, ou cujo interesse reside na variação entre eles e não nos efeitos específicos de cada nível. Devido a essas vantagens alguns experimentos em mesocosmos já aderiram ao uso desses modelos GLMM (BROWN; THERRIAULT; HARLEY, 2016; LEFCHECK; DUFFY, 2015; RICHARDSON *et al.*, 2019), incluindo experimentos ecotoxicológicos em mesocosmos (DOMENE; MATTANA; SÁNCHEZ-MORENO, 2021; PITOMBEIRA *et al.*, 2020; ROBINSON *et al.*, 2019).

Para os três grupos de organismos, apenas o modelo GLMM com Cladocera como variável resposta apresentou significância dos efeitos aleatórios mesocosmos e dias. Isto

significa que 32,45% da variância da abundância de Cladocera é explicada devido a variabilidade aleatória entre as réplicas dos mesocosmos e 18,82% é devido ao tempo. Apesar do alto valor dos C.V. ao longo do tempo para a abundância de Copepoda e Rotífera, os efeitos aleatórios acima mencionados não foram significativos, ou seja, a variabilidade aleatória entre os mesocosmos e os dias não explicam a variância na abundância desses dois grupos. Os C.V. dos grupos Rotífera e Cladocera foram maiores que a de Copepoda. SANDERSON *et al.* (2009), como em nosso trabalho, também encontraram os menores valores da variabilidade entre réplicas e também uma menor amplitude na flutuação da variabilidade ao longo do tempo para a abundância de Copepoda e o zooplâncton total. De acordo com esses autores e com KNAUER *et al.* (2005) os grupos mais abundantes da comunidade apresentam menores valores de C.V. entre réplicas (entre ~35 e 75% e raramente excedendo 100%), enquanto os menos abundantes apresentam maiores variabilidades (maior parte dos casos excedendo 100%). Em nosso estudo, os copépodos foram o grupo de organismos com maior representatividade e abundância no Controle e 2,4-D ao longo do experimento, com exceção do dia 73 em que Cladocera e Rotífera aumentam sua abundância nesses tratamentos, sendo quase comparável a abundância de Copepoda. Em relação aos rotíferos essa variabilidade pode ser explicada por meio da biologia, pois os rotíferos possuem muitas espécies oportunistas e r estrategistas, as quais se adaptam rapidamente as condições ambientais durante seu ciclo de vida (SANDERSON *et al.*, 2009).

Em relação aos tratamentos Fipronil e 2,4-D+Fipronil, os altos C.V. se devem a baixa abundância de organismos e a diferença entre as réplicas, por exemplo: para copépodos em umas das réplicas de Fipronil para o dia 2 foram contabilizados 27 ind L<sup>-1</sup>, enquanto nas outras duas houve 0 organismo; e em relação a Cladocera, para o mesmo tratamento, no mesmo dia, em uma das réplicas houve 0 organismo, enquanto nas outras duas foram contabilizados 1 e 2 ind L<sup>-1</sup>, respectivamente. Segundo WARWICK; CLARK (1993) a variabilidade entre as réplicas de áreas impactadas são maiores que a das não impactadas. RESENDE (2015), porém, não encontrou uma grande variabilidade para as variáveis de zooplâncton entre as réplicas dos mesocosmos contaminados por abamectina (Vertimec 18®). A flutuação e amplitude da C.V. ao longo do tempo, quando os tratamentos são comparados entre si (Controle, 2,4-D, Fipronil e 2,4-D+Fipronil), parece depender da intensidade do impacto e do perturbador/contaminante. Segundo a

classificação do potencial de periculosidade ambiental, 2,4-D é classificado como III - considerado um produto perigoso ao meio ambiente (ADAPAR, 2020a), e o fipronil é classificado como II – muito perigoso ao meio ambiente (ADAPAR, 2020b). O efeito de 2,4-D na comunidade de zooplâncton foi menor em relação ao Fipronil e 2,4-D+Fipronil, sendo a amplitude da variação da flutuação da C.V. dos organismos do zooplâncton ao longo do tempo menor neste tratamento do que nos tratamentos de Fipronil e 2,4-D+Fipronil. Neste último tratamento a amplitude de C.V para cladóceros de uma coleta para outra foi de 0% à 173%.



**Figura 31.** Coeficientes de variação (C.V.) da abundância de Cladocera, de Copepoda, de Rotífera e do zooplâncton total (Total) (%) ao longo do tempo entre os mesocosmos (réplicas) dos tratamentos: **a)** Controle; **b)** 2,4-D; **c)** Fipronil; e **d)** 2,4-D+Fipronil. Os dias de coletas estão distribuídos referente ao dia da contaminação (dia 0). Control = tratamento controle. Group = grupos.

## 6.2.4 Conclusão

Os agrotóxicos 2,4-D e Fipronil, tanto isolado como em mistura, causaram efeitos sobre a comunidade zooplanctônica e também nas interações biológicas entre esses

grupos. As populações de Cladocera e Copepoda foram totalmente eliminadas nos tratamentos com Fipronil, sendo que nestes tratamentos houve o aumento das populações de Rotífera, beneficiada pela diminuição da competição entre os outros grupos zooplanctônicos. No tratamento 2,4-D houve o aumento da população de Copepoda e a diminuição de Rotífera, devido a efeitos indiretos desse contaminante. Os fatores abióticos, os quais foram descritos pela análise PCA em PCs, também causaram efeitos ao longo do experimento na abundância dos três grupos analisados. A abundância dos copépodos foi a única que foi alterada devido aos efeitos da variável fixa dos dias e da interação entre os tratamentos e variáveis abióticas. Ainda, os efeitos aleatórios dos mesocosmos e dos dias só foram significativos para a abundância de Cladocera. Assim, a presença desses agrotóxicos em águas superficiais de ambientes lênticos em concentrações ambientais podem causar efeitos diretos e indiretos nos grandes grupos do zooplâncton (Cladocera, Copepoda e Rotífera).



### 6.3 **CAPÍTULO 3: OS EFEITOS AGUDOS DE FIPRONIL E 2,4-D, ISOLADOS E EM MISTURA: UMA AMEAÇA AO COPÉPODA CALANOIDA DE ÁGUA DOCE *Notodiaptomus iheringi***

Nesta etapa da pesquisa, e de forma semelhante ao capítulo anterior, os resultados e discussão foram apresentados de forma conjunta, com inserção de figuras e tabelas no decorrer do texto e a indicação dos apêndices/ anexos, quando necessário. Ao final do capítulo, as principais conclusões foram apresentadas.

#### 6.3.1 **Teste de toxicidade com os agrotóxicos isolados**

Em todos os testes realizados com os dois agrotóxicos, nos tratamentos controles a mortalidade de *N. iheringi* foi menor que 10 %. Os valores das variáveis físicas e químicas dos tratamentos estavam de acordo com o protocolo da ABNT (2017) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Valores iniciais (0 h) das médias e dos desvios padrão (DP) do potencial de hidrogênio (pH), oxigênio dissolvido (OD) e condutividade elétrica (CE), bem como os valores finais das médias e DP (48 h) do pH e OD de todos os tratamentos dos testes de toxicidade aguda dos agrotóxicos isolados. Os tratamentos (T) estão apresentados na tabela como concentração nominal dos agrotóxicos. Para Fipronil (Regent 800<sup>®</sup>WG): **Cr**) controle sem fipronil; **R1**) 1,5 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R2**) 3 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R3**) 6 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R4**) 12 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; e **R5**) 24 µg L<sup>-1</sup> de fipronil. Para 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR): **Cd**) controle sem 2,4-D; **D1**) 420 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D2**) 480 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D3**) 540 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D4**) 600 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; e **D5**) 660 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

<b>Fipronil</b>								
<b>Tempo</b>		<b>0 h</b>			<b>Tempo</b>		<b>48 h</b>	
<b>T</b>	<b>pH Média DP</b>	<b>OD (mg L<sup>-1</sup>) Média DP</b>	<b>CE (µS cm<sup>-1</sup>) Média DP</b>	<b>T</b>	<b>pH Média DP</b>	<b>OD (mg L<sup>-1</sup>) Média DP</b>	<b>CE (µS cm<sup>-1</sup>) Média DP</b>	
<b>Cr</b>	7,51 ± 0,07	7,28 ± 0,29	182,26 ± 16,34	<b>Cr</b>	7,51 ± 0,12	7,10 ± 0,15	-	
<b>R1</b>	7,53 ± 0,02	7,30 ± 0,31	184,43 ± 16,83	<b>R1</b>	7,55 ± 0,17	6,98 ± 0,12	-	
<b>R2</b>	7,54 ± 0,04	7,28 ± 0,32	178,90 ± 14,55	<b>R2</b>	7,51 ± 0,07	7,00 ± 0,13	-	
<b>R3</b>	7,52 ± 0,01	7,26 ± 0,31	177,16 ± 14,15	<b>R3</b>	7,56 ± 0,04	7,00 ± 0,13	-	
<b>R4</b>	7,54 ± 0,02	7,22 ± 0,25	175,56 ± 14,29	<b>R4</b>	7,53 ± 0,02	7,08 ± 0,11	-	
<b>R5</b>	7,52 ± 0,02	7,25 ± 0,26	172,43 ± 13,44	<b>R5</b>	7,52 ± 0,09	7,03 ± 0,03	-	
<b>2,4-D</b>								

Tempo		0 h		Tempo		48 h	
T	pH Média DP	OD (mg L <sup>-1</sup> ) Média DP	CE (μS cm <sup>-1</sup> ) Média DP	T	pH Média DP	OD (mg L <sup>-1</sup> ) Média DP	CE (μS cm <sup>-1</sup> ) Média DP
<b>Cd</b>	7,60 ± 0,09	7,05 ± 0,12	177,16 ± 6,39	<b>Cd</b>	7,62 ± 0,10	7,02 ± 0,12	-
<b>D1</b>	7,43 ± 0,06	7,04 ± 0,05	321,00 ± 7,54	<b>D1</b>	7,54 ± 0,13	6,90 ± 0,19	-
<b>D2</b>	7,35 ± 0,04	6,99 ± 0,11	330,00 ± 1,73	<b>D2</b>	7,46 ± 0,14	6,91 ± 0,18	-
<b>D3</b>	7,31 ± 0,03	6,99 ± 0,05	350,00 ± 2,00	<b>D3</b>	7,52 ± 0,13	6,92 ± 0,19	-
<b>D4</b>	7,30 ± 0,03	7,03 ± 0,005	366,66 ± 4,16	<b>D4</b>	7,50 ± 0,14	6,86 ± 0,15	-
<b>D5</b>	7,32 ± 0,02	6,99 ± 0,02	387,33 ± 3,21	<b>D5</b>	7,53 ± 0,14	6,83 ± 0,18	-

Os resultados da média e do desvio padrão da quantificação química dos três testes de fipronil (μg L<sup>-1</sup>) foram (0 h – 48 h): R1= 2,45 ±0,49 – 1,81 ±0,26; R2= 2,23 ±0,31 – 2,04 ±0,20; R3= 3,07 ±0,91 – 2,68 ±0,48; R4= 4,30 ±1,75 – 4,15 ±1,43; e R5= 7,23 ±3,07 – 7,43 ±2,78; e de 2,4-D (mg L<sup>-1</sup>) foram (0 h – 48 h): D1= 386,63 ±52,56 – 408,05 ±31,93; D2= 466,70 ±49,22 – 471,75 ±49,88; D3= 535,77 ±58,50 – 523,75 ±62,31; D4= 564,20 ±63,84 – 591,57 ±41,57; e D5= 633,10 ±42,19 – 630,30 ±45,52. A Tabela 5 mostra os valores da quantificação química de cada um dos testes para cada um dos agrotóxicos.

**Tabela 5.** Valores iniciais (0 h) e finais (48 h) da análise de quantificação química de Fipronil (Regent 800<sup>®</sup>WG) e 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup>BR) no teste agudo dos agrotóxicos isolados. 1, 2 e 3 indicam cada teste de toxicidade aguda realizado com cada um dos agrotóxicos. Tratamentos (T) estão representados na tabela como a concentração nominal dos agrotóxicos. Para Fipronil: **Cr**) controle sem fipronil; **R1**) 1,5 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R2**) 3 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R3**) 6 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R4**) 12 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; e **R5**) 24 µg L<sup>-1</sup> de fipronil. Para 2,4-D: **Cd**) controle sem 2,4-D; **D1**) 420 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D2**) 480 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D3**) 540 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D4**) 600 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; e **D5**) 660 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. O limite de quantificação (LOQ) para Fipronil e 2,4-D foram 0,50 e 5,00 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Fipronil (µg L <sup>-1</sup> )							
Tempo	0 h			Tempo	48 h		
T	1	2	3	T	1	2	3
<b>Cr</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<b>Cr</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<b>R1</b>	2,10	<LOQ	2,80	<b>R1</b>	2,00	<LOQ	<LOQ
<b>R2</b>	2,50	1,90	2,30	<b>R2</b>	2,20	1,80	2,20
<b>R3</b>	3,90	2,10	3,20	<b>R3</b>	3,20	2,10	2,50
<b>R4</b>	6,10	2,60	4,20	<b>R4</b>	6,00	2,50	4,00
<b>R5</b>	9,70	3,80	8,20	<b>R5</b>	9,80	3,60	7,20

2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )							
Tempo	0 h			Tempo	48 h		
T	1	2	3	T	1	2	3
<b>Cd</b>	<LOQ	<LOQ	0,032	<b>Cd</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<b>D1</b>	430,30	401,33	328,28	<b>D1</b>	428,66	415,90	360,83
<b>D2</b>	519,16	459,31	421,53	<b>D2</b>	516,47	485,88	400,27
<b>D3</b>	583,53	553,21	470,41	<b>D3</b>	565,43	545,65	431,09
<b>D4</b>	629,98	573,28	496,28	<b>D4</b>	619,52	610,99	529,71
<b>D5</b>	677,37	628,50	593,45	<b>D5</b>	672,99	596,51	585,62

Os resultados das médias e dos desvios padrão das CL<sub>10-48h</sub>, CL<sub>20-48h</sub> e CL<sub>50-48h</sub> do fipronil para *N. iheringi* (Figura 32a) foram 2,38 ±0,48, 3,08 ±1,14 e 4,97 ±3,30 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes valores foram calculados usando a concentração quantificada de cada tratamento pela análise química (mais detalhes estão nas Tabela 5 e 6). Comparado a Cladocera, *N. iheringi* foi mais sensível ao fipronil que: *C. dubia* (CL<sub>50-96h</sub>= 143,43 µg L<sup>-1</sup>(QIN *et al.*, 2011); *C. dubia* CL<sub>50-48h</sub>= 17,70 µg L<sup>-1</sup> (KONWICK *et al.*, 2005)); *D. pulex* ( não apresentou sensibilidade (CHATON *et al.*, 2002); *D. pulex* CL<sub>50-48h</sub>=15,60 µg L<sup>-1</sup> (STARK; VARGAS, 2005)); *D. magna* (CL<sub>50-48h</sub>= 190,00 µg L<sup>-1</sup> (US EPA, 2018) ; *D. magna* CL<sub>50-48h</sub>= 88,30 µg L<sup>-1</sup>(HAYASAKA *et al.*, 2012b); e *Simocephalus elizabethae* King 1853 (CL<sub>50-48h</sub>= 11,13 µg L<sup>-1</sup> (STEVENS *et al.*, 2011). E quanto a *C. silvestrii* (CL<sub>50-48h</sub>= 3,90 µg L<sup>-1</sup>), *N. iheringi* foi 1,27 vezes menos sensível ao fipronil que este cladóceros (SILVA *et al.*, 2020).

**Tabela 6.** Concentrações letais para 10, 20 e 50% (CL<sub>10</sub>, CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>) de *Notodiaptomus iheringi* expostos durante 48 h ao Fipronil (Regent 800<sup>®</sup>WG) e a 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup>BR) do teste 1, 2 e 3. Estes valores foram calculados utilizando a concentração quantificada de cada tratamento pela análise de quantificação química. IC é o intervalo de confiança de 95%. Os valores das médias e desvios padrão (DP) de CL<sub>10</sub>, CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub> também constam na tabela.

<b>Fipronil (µg L<sup>-1</sup>)</b>				
<b>Parâmetro</b>	<b>Teste 1</b>	<b>Teste 2</b>	<b>Teste 3</b>	<b>Média DP</b>
CL <sub>10</sub>	2,93	2,10	2,10	2,38
IC (95%)	1,74 – 4,12	1,87 – 2,34	1,65 – 2,56	± 0,48
CL <sub>20</sub>	4,39	2,32	2,52	3,08
IC (95%)	3,12 - 5,66	2,11 – 2,53	2,10 – 2,93	± 1,14
CL <sub>50</sub>	8,75	2,74	3,42	4,97
IC (95%)	5,75 – 11,75	2,50 – 2,98	2,95 – 3,90	± 3,30
<b>2,4-D (mg L<sup>-1</sup>)</b>				
<b>Parâmetro</b>	<b>Teste 1</b>	<b>Teste 2</b>	<b>Teste 3</b>	<b>Média DP</b>
CL <sub>10</sub>	404,23	360,44	348,87	371,18
IC (95%)	319,05 – 489,40	315,37- 405,50	323,71 – 374,04	± 29,20
CL <sub>20</sub>	467,78	387,17	365,83	406,93
IC (95%)	403,62 – 531,95	349,07- 425,26	346,11 – 385,56	± 53,77
CL <sub>50</sub>	600,43	437,53	396,76	478,24
IC (95%)	551,11 – 649,76	410,64- 464,42	382,97 – 410,55	± 107,77

Para os copépodos *A. robustus* e *D. castor* as CL<sub>50-48h</sub> ao fipronil foram 84,89 e 3,45 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente (CHATON *et al.*, 2002). *A. robustus* (Cyclopoida) e *D. castor* (Calanoida) são de diferentes ordens de copépodos. Calanoida são geralmente mais sensíveis a variações ambientais (MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2003) e aos agrotóxicos (WILLIS; LING, 2003) que Cyclopoida (CASTILHO-NOLL *et al.*, 2012). *N. iheringi* foi 1,44 vezes menos sensível ao fipronil em relação a *D. castor*, apesar dos dois serem da mesma família (Diaptomidae).

Adultos sem distinção de sexo de *A. tenuiremis* foram 1,37 vezes menos sensível (CL<sub>50-96h</sub> = 6,80 µg L<sup>-1</sup>) ao fipronil que *N. iheringi* (CHANDLER *et al.*, 2004). Porém, o mesmo estudo comparou a sensibilidade de machos e fêmeas sem ovos e obtiveram uma CL<sub>50-96h</sub> de 3,50 e 13,00 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. MEDINA *et al.* (2002) também observaram uma maior tolerância de fêmeas de *A. tonsa* a cipermetrina que machos da mesma espécie. Neste estudo não foi testada a diferenciação de sensibilidade em relação ao sexo de *N. iheringi*, mas foi respeitada a razão de sexo 2:2 em cada réplica. Além disso, *N. iheringi* e *A. tenuiremis* (ordem: Harpacticoida; estuarino) são de diferentes ordens,

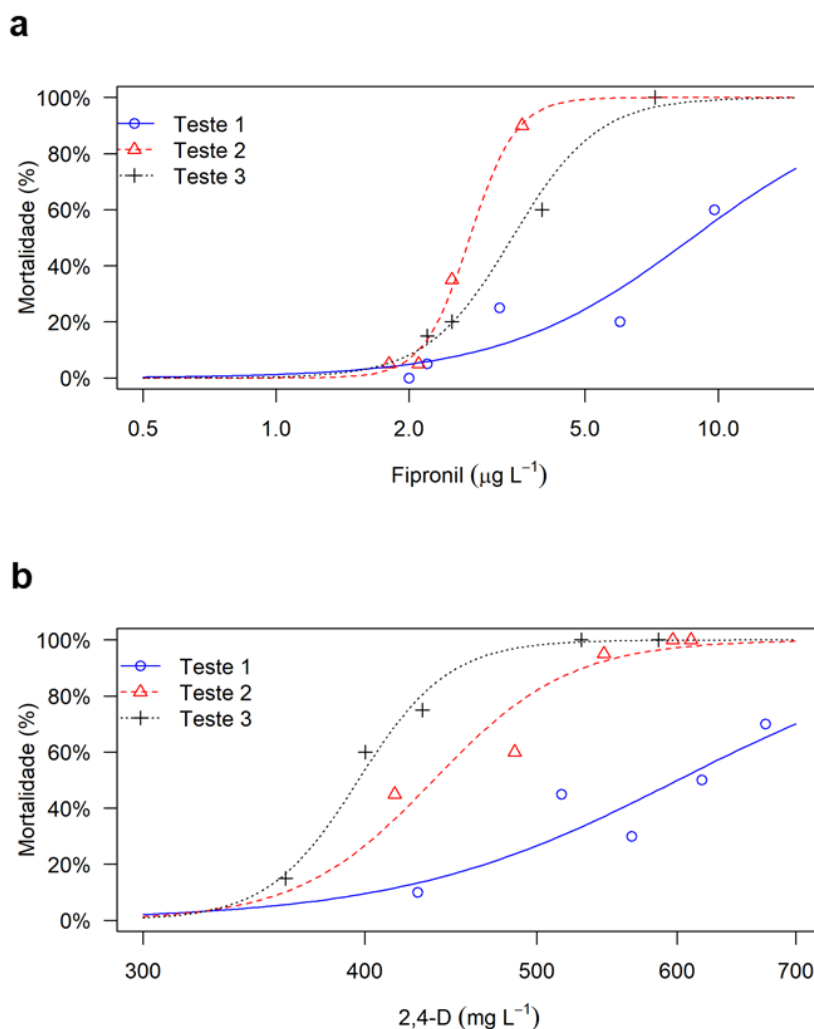
vivem em habitat diferentes e têm hábitos diferentes (pelágico e meio bentônico, respectivamente)(CHANDLER *et al.*, 2004; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2003).

Para 2,4-D, as médias e os desvios padrão das  $CL_{10-48h}$ ,  $CL_{20-48h}$  e  $CL_{50-48h}$  ao *N. iheringi* foram  $371,18 \pm 29,20$ ,  $406,93 \pm 53,77$  e  $478,24 \pm 107,77$  mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 32b). Estes valores foram calculados através da concentração quantificada de cada tratamento pela análise química (mais detalhes estão nas Tabela 5 e 6). *C. dubia* ( $CL_{50-48h} = 236,00$  mg L<sup>-1</sup>(ORIS; WINNER; MOORE, 1991) e  $CL_{50-24h} = 272,50$  mg L<sup>-1</sup>(MILAM *et al.*, 2005)), *D. magna* ( $CL_{50-48h} = 36,40$  mg L<sup>-1</sup>(ALEXANDER; GERSICH; MAYES, 1985) e  $CL_{50-24h} = 415,70$  mg L<sup>-1</sup>(MILAM *et al.*, 2005)); e *C. silvestrii* ( $CL_{50-48h} = 169,00$  mg L<sup>-1</sup>(SILVA *et al.*, 2020)) foram mais sensíveis ao 2,4-D que *N. iheringi*. O Calanoida *S. chelospinus* em 24 e 48 h foi 199,26 e 258,50 vezes mais sensível ao 2,4-D ( $CL_{50-24h} = 2,40$  mg L<sup>-1</sup> e  $CL_{50-48h} = 1,85$  mg L<sup>-1</sup>) que *N. iheringi* (US EPA, 2018). A espécie *E. gracilis* (Calanoida) ( $CL_{50-96h} = 144,10$  mg L<sup>-1</sup>) foi mais sensível ao 2,4-D que *N. iheringi* (US EPA, 2018).

Estágios mais jovens são conhecidos por serem mais sensíveis que os adultos (MEDINA *et al.*, 2002) e ciclopóidas são conhecidos por serem mais tolerantes a agrotóxicos em relação aos copépodos calanoidas (CASTILHO-NOLL *et al.*, 2012). Entretanto, comparando os resultados do presente estudo com os de HOUSSOU *et al.* (2018), observa-se que os náuplios ( $CL_{50-48h} = 96,79$  mg L<sup>-1</sup>) e os adultos ( $CL_{50-48h} = 101,70$  mg L<sup>-1</sup>) de *Cyclops abyssorum* Sars 1863 (Cyclopoida) foram mais sensíveis ao 2,4-D que *N. iheringi*. Ainda, comparando com os resultados de ROBERTSON e BUNTING (1976), os náuplios de 0-4 h de *Cyclops vernalis* Fischer 1853 (Cyclopoida) foram menos sensíveis a formulação do i.a. de 2,4-D em 48 h (Dow Chemical Company:  $CL_{50-48h} = 662,11$  mg L<sup>-1</sup>) do que *N. iheringi*. Porém, náuplios dessa mesma espécie foram mais sensíveis à mesma substância em 96 h (Dow Chemical Company:  $CL_{50-96h} = 142,00$  mg L<sup>-1</sup>) e ao i.a. de 2,4-D puro ( $CL_{50-48h} = 37,42$  mg L<sup>-1</sup>; e  $CL_{50-96h} = 8,72$  mg L<sup>-1</sup>) que *N. iheringi*.

Muitos dos estudos acima citados testaram formulações comerciais do i.a. dos agrotóxicos (HAYASAKA *et al.*, 2012b; MILAM *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2020; STARK; VARGAS, 2005; STEVENS *et al.*, 2011; US EPA, 2018), enquanto outros avaliaram o i.a. puro (ALEXANDER; GERSICH; MAYES, 1985; CHANDLER *et al.*,

2004; CHATON *et al.*, 2002; HOUSSOU *et al.*, 2018; KONWICK *et al.*, 2005; ORIS; WINNER; MOORE, 1991; QIN *et al.*, 2011; STEVENS *et al.*, 2011; US EPA, 2018). De acordo com STARK e VARGAS (2005) a formulação comercial tem o potencial de ser mais tóxica aos organismos em relação ao i.a. puro. Por outro lado, PEREIRA *et al.* (2009) observaram que as formulações comerciais podem superestimar ou subestimar a toxicidade dos i.a. Existem muitas formulações comerciais, sendo que só no Brasil 81 são permitidas utilizando fipronil como i.a. e 102 utilizando 2,4-D (AGROFIT, 2022). Cada formulação comercial é única, consistindo de sua própria concentração do i.a. e de outros compostos com diferentes funções, os quais são considerados não serem tóxicos aos organismos, por esse motivo são chamados de produtos inertes (p.i.) (TOMINACK; TOMINACK, 2000). O objetivo do p.i. é melhorar a estabilidade, a dissolução e a persistência do i.a. (COX; SURGAN, 2006); e muitos autores acreditam que os p.i. contribuem para a toxicidade da formulação comercial (COX; SURGAN, 2006; DEMETRIO; BONETTO; RONCO, 2014; MESNAGE; ANTONIOU, 2018; NAGY *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2009; STARK; VARGAS, 2005). Portanto, formulações comerciais diferentes utilizando o mesmo i.a. podem demonstrar toxicidades diferentes para uma mesma espécie (MESNAGE; ANTONIOU, 2018). Vale ressaltar que o estudo de SILVA *et al.* (2020) foi o único que utilizou as mesmas formulações comerciais deste estudo. Assim, as diferenças observadas entre os dados de *N. iheringi* e os dos estudos que utilizaram formulações comerciais podem estar relacionadas com a presença de diferentes p.i. de cada formulação. Os estudos com formulações comerciais são mais realistas, pois consideram a entrada no ambiente natural da mistura do i.a. e p.i presente nos produtos comerciais, os quais são amplamente utilizados pelos agricultores.



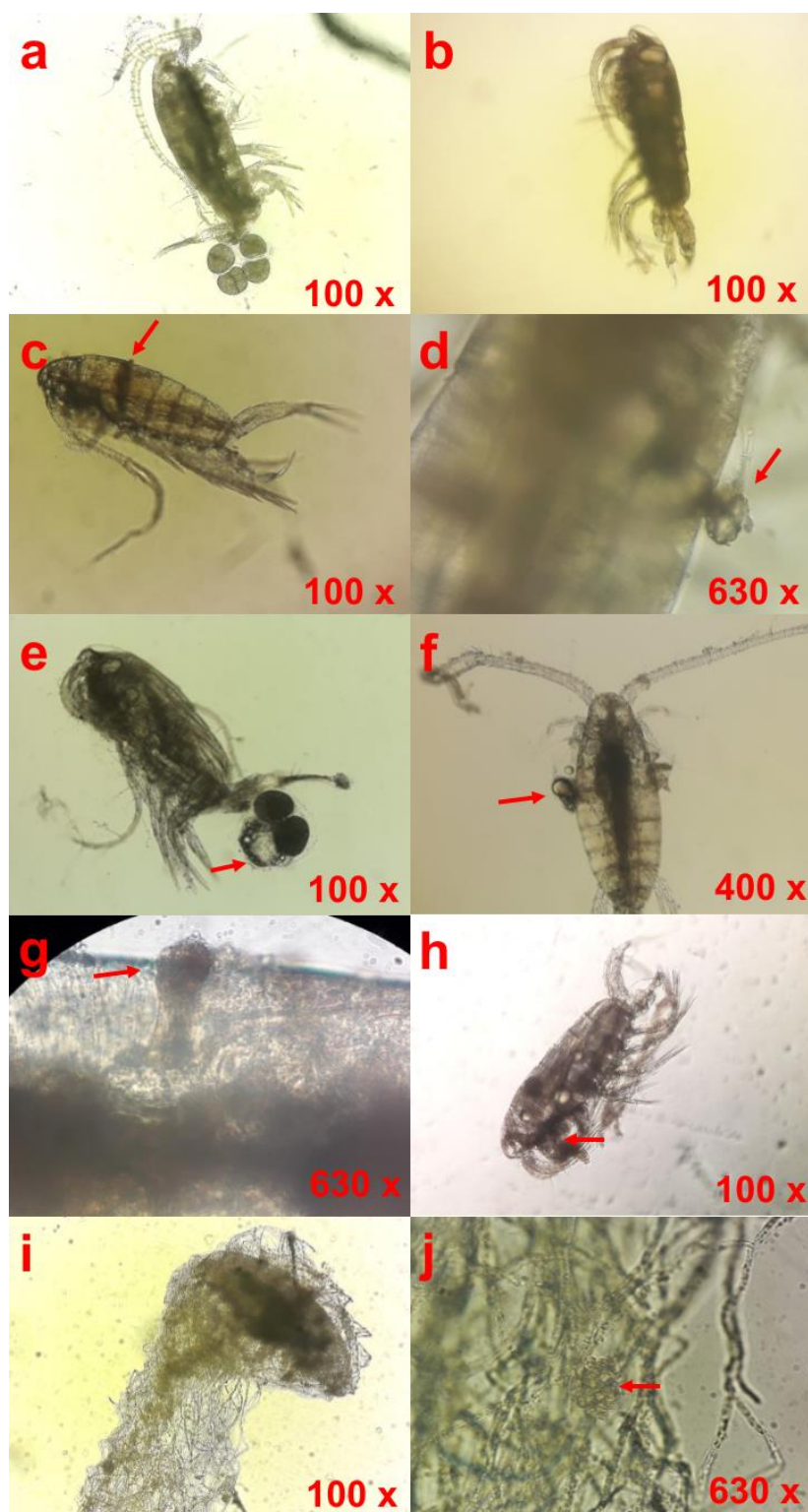
**Figura 32.** Curva de dose-resposta de adultos de *Notodiaptomus iheringi* expostos à: **a)** Fipronil (Regent 800<sup>®</sup> WG); e **b)** 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR).

Alguns organismos expostos aos tratamentos de fipronil (Figura 33) e de 2,4-D (Figura 34), com exceção da concentração R1, apresentaram anomalias parecidas com tumores (*tumor-like anomalies*). Essas anomalias se parecem com prolapso intestinal, extrusão do protoplasma e rompimento da carapaça quitinosa. ROBERTSON e BUNTING (1976) observaram que o 2,4-D causou uma hérnia intestinal em náuplios de copépodos. Alguns autores sugerem como causa dessas deformidades a poluição, os estressores ambientais e os parasitas (AL-AIDAROOS; MANTHA, 2018; ALVARADO-FLORES *et al.*, 2022; OMAIR *et al.*, 1999, 2001). Ainda, somente na concentração R5 (a mais alta de fipronil) houve o surgimento de fungos filamentosos cobrindo os corpos dos organismos mortos (Figura 33i e 33g) e sem mudanças na qualidade da água (pH e

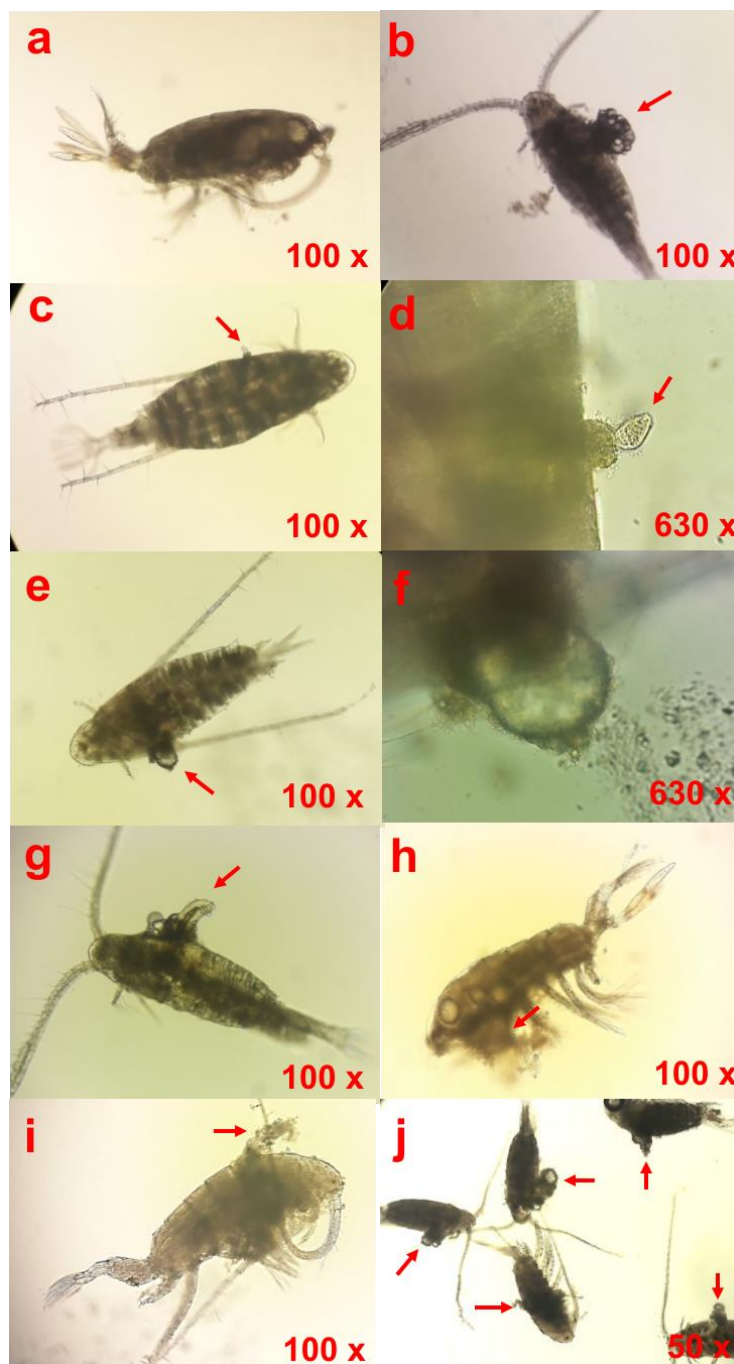
OD). Sabe-se que inseticidas podem afetar de forma negativa a diversidade e a estrutura de comunidades microbianas aquáticas, diminuindo a abundância de alguns grupos e aumentando o número de espécies tolerantes (MUTURI *et al.*, 2017) como os fungos, que aproveitam a oportunidade para crescerem (KEERTHI; THANGA, 2016).

Fêmeas com ovos foram observadas nos tratamentos Cr, R1, R2, R3 e R4; e fêmeas com espermatóforos em todos os tratamentos contaminados com 2,4-D. Os efeitos desses agrotóxicos na reprodução não foi o objetivo deste estudo e por essa razão eles não foram testados. Fipronil e 2,4-D são conhecidos por afetarem negativamente a reprodução de copépodos (CHANDLER *et al.*, 2004; HOUSSOU *et al.*, 2018). Portanto, avaliar a dimensão prejudicial/ tóxica de fipronil e 2,4-D na reprodução desses organismos é importante e deve ser testada em futuros estudos.





**Figura 33.** *Notodiaptomus iheringi* exposto ao fipronil (Regent 800<sup>®</sup> WG) durante 48 h. **a)** fêmea ovada do Cr (controle sem agrotóxicos); **b)** macho do Cr; **c e d)** macho do R2; **e)** fêmea ovada com um ovo inviável do R3; **f e g)** macho do R4; e **h, i e j)** macho do R5. As flechas vermelhas apontam para as deformidades, com exceção da figura “j”, a qual aponta para uma estrutura reprodutiva do fungo (conídio). Concentrações nominais - **Cr:** controle sem fipronil; **R1:** 1,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R2:** 3,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R3:** 6,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; **R4:** 12,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil; e **R5:** 24,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil.



**Figura 34.** *Notodiaptomus iheringi* exposto ao 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR) durante 48 h. **a)** fêmea com espermatóforo do Cd (controle sem agrotóxicos); **b)** macho do D1; **c e d)** fêmea do D1; **e e f)** fêmea do D2; **g)** macho do D3; **h e i)** fêmea do D4; e **j)** conjunto de copépodos do D5. As flechas vermelhas apontam para as deformidades. Concentrações nominais- **Cd**: controle sem 2,4-D; **D1**: 420 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D2**: 480 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D3**: 540 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D4**: 600 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; e **D5**: 660 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

Conforme a discussão e os dados apresentados anteriormente, *N. iheringi* mostrou ser mais sensível ao fipronil que muitas espécies de cladóceros frequentemente utilizados em testes ecotoxicológicos (CONNORS *et al.*, 2022). De acordo com KULKARNI *et al.*

(2013) copépodos são espécies vulneráveis (*i.e.* sensíveis; com alta probabilidade de serem expostos a contaminantes e quando isto acontece eles apresentam dificuldade em se recuperarem). O copépodo *N. iheringi* tem um maior ciclo de vida que espécies (tempo de desenvolvimento de ovo à ovo de 13,39 d e longevidade de 61,61 d à 26 °C (RIETZLER; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2002)) e mais estágios de desenvolvimento (náuplios I-VI, copepodito I-VI, copepodito VI (adulto macho e fêmea)(RIETZLER; MATSUMURA-TUNDISI; TUNDISI, 2002)) que os cladóceros (tempo de desenvolvimento de neonato à primípara de 3 à 4 d e longevidade de 29,80 d à 25 °C (FONSECA; ROCHA, 2004)). Um maior ciclo de vida aumenta o risco de um organismo ser exposto aos contaminantes durante a vida (KULKARNI *et al.*, 2013) e estágios mais jovens de copépodes tem sido reportados como mais sensíveis que os adultos (CASTAÑO-SÁNCHEZ *et al.*, 2021; HEUSCHELE *et al.*, 2022; MEDINA *et al.*, 2002; MOHAMMED, 2013). Além disso, copépodos são potenciais vetores de biomagnificação de contaminantes na cadeia alimentar, uma vez que possuem diferentes dietas ao longo de seus estágios de desenvolvimento, e organismos aquáticos de níveis tróficos superiores se alimentam deles (KULKARNI *et al.*, 2013). Portanto, enfatiza-se a importância dos copépodos de água doce na ecotoxicologia. Além disso, estudos utilizando outras abordagens ecotoxicológicas, como por exemplo, avaliando os efeitos dos agrotóxicos na reprodução e nos diferentes estágios de desenvolvimento, devem ser testadas com essa espécie.

### **6.3.2 Teste de toxicidade com a mistura dos agrotóxicos**

O controle teve mortalidade menor que 10%. Os valores das variáveis físicas e químicas dos tratamentos estavam de acordo com o protocolo (ABNT, 2017) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores iniciais (0 h) das médias e dos desvios padrão (DP) do potencial de hidrogênio (pH), oxigênio dissolvido (OD) e condutividade elétrica (CE), bem como os valores finais das médias e DP (48 h) do pH e OD de todos os tratamentos do teste de toxicidade aguda com a mistura dos agrotóxicos. Os tratamentos (T) estão apresentados na tabela como concentração nominal dos agrotóxicos. Para Fipronil (Regent 800<sup>®</sup>WG): **Cr**) controle sem fipronil; **R1**) 1,5 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R2**) 3 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R3**) 6 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R4**) 12 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; e **R5**) 24 µg L<sup>-1</sup> de fipronil. Para 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup>BR): **Cd**) controle sem 2,4-D; **D1**) 420 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D2**) 480 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D3**) 540 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D4**) 600 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; e **D5**) 660 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Para a mistura de Regent 800<sup>®</sup>WG com DMA 806<sup>®</sup>BR: **Cm**) controle sem agrotóxicos; **M1**) R1 com D1; **M2**) R1 com D5; **M3**) R3 com D1; **M4**) R3 com D5; **M5**) R5 com D1; e **M6**) R5 com D5.

Tempo	Mistura				
	0 h			48 h	
T	pH	OD (mg L <sup>-1</sup> )	CE (µS cm <sup>-1</sup> )	pH	OD (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Cm</b>	7,34	7,23	162,70	7,40	7,73
<b>R1</b>	7,28	7,33	160,10	7,28	7,70
<b>R2</b>	7,22	7,28	157,30	7,28	7,67
<b>R3</b>	7,20	7,28	158,70	7,21	7,59
<b>R4</b>	7,18	7,27	153,10	7,19	7,57
<b>R5</b>	7,16	7,23	153,80	7,17	7,67
<b>D1</b>	7,02	7,33	290,00	7,09	7,34
<b>D2</b>	7,00	7,30	311,00	7,11	7,44
<b>D3</b>	7,02	7,38	327,00	7,14	7,43
<b>D4</b>	6,96	7,77	349,00	7,09	7,38
<b>D5</b>	6,95	7,19	366,00	7,08	7,44
<b>M1</b>	7,02	7,33	292,00	7,07	7,53
<b>M2</b>	7,03	7,25	368,00	7,06	7,52
<b>M3</b>	7,05	7,23	287,00	7,05	7,46
<b>M4</b>	6,98	7,28	363,00	7,03	7,50
<b>M5</b>	7,00	7,29	283,00	7,02	7,53
<b>M6</b>	7,07	7,27	357,00	7,01	7,50

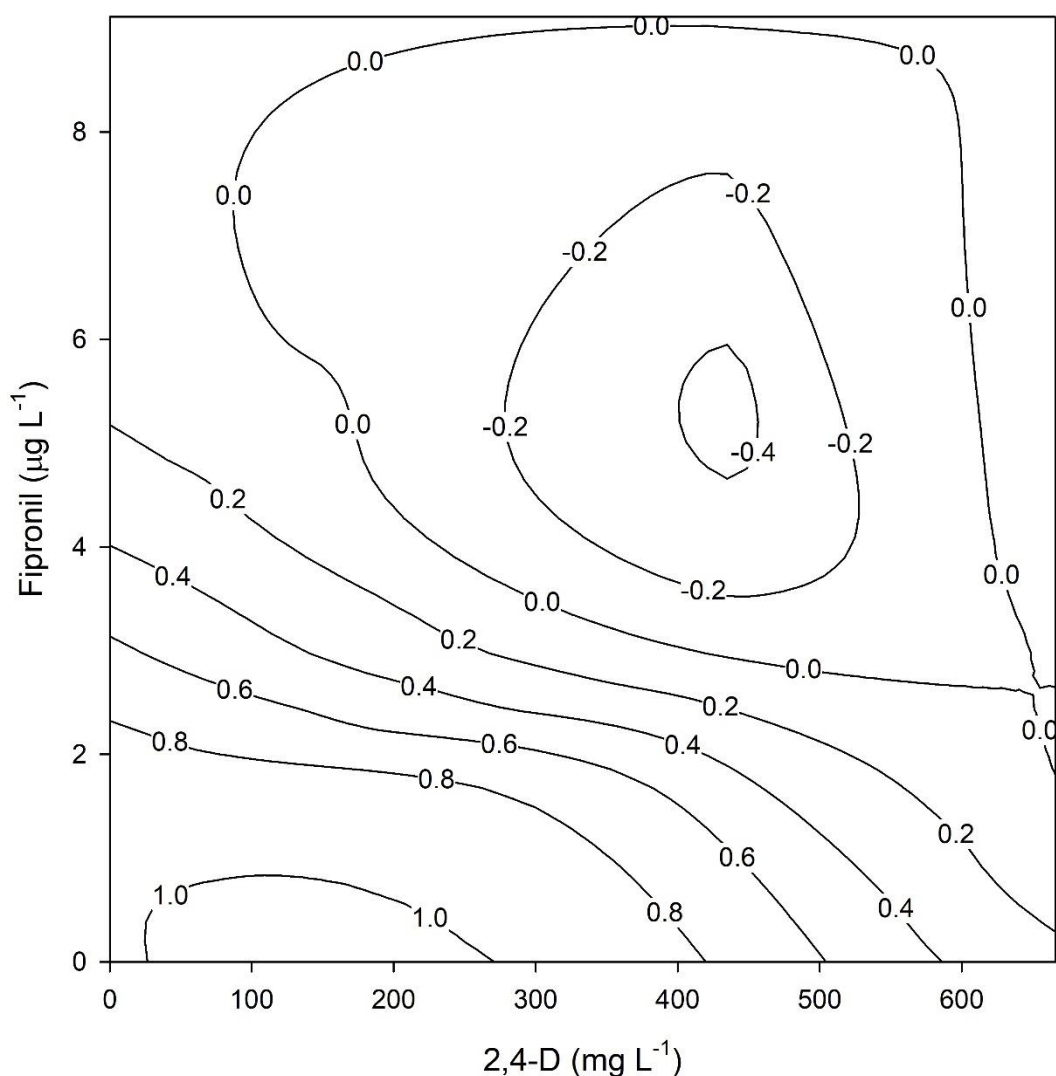
Os valores finais, em 48 h, da quantificação química dos agrotóxicos para o teste de para cada um dos tratamentos constam na Tabela 8. Devido uma limitação no método químico não foi possível quantificar a concentração de fipronil nos tratamentos das misturas.

**Tabela 8.** Valores finais (48 h) da análise de quantificação química de fipronil (Regent 800<sup>®</sup>WG) e de 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR) no teste agudo da mistura dos agrotóxicos. Tratamentos (T) estão representados na tabela como a concentração nominal dos agrotóxicos: **Cm**) controle sem agrotóxicos;; **R1**) 1,5 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R2**) 3 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R3**) 6 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R4**) 12 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; **R5**) 24 µg L<sup>-1</sup> de fipronil.; **Cd**) controle sem 2,4-D; **D1**) 420 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D2**) 480 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D3**) 540 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D4**) 600 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; **D5**) 660 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.; **M1**) R1 com D1; **M2**) R1 com D5; **M3**) R3 com D1; **M4**) R3 com D5; **M5**) R5 com D1; e **M6**) R5 com D5. O limite de quantificação (LOQ) para Fipronil e 2,4-D foram 0,50 e 5,00 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tempo	Mistura					
	48 h					
T	Fipronil (µg L <sup>-1</sup> )	2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	-	-
<b>Cm</b>	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-
<b>R1</b>	1,63	0,004	-	-	-	-
<b>R2</b>	1,97	0,003	-	-	-	-
<b>R3</b>	2,93	0,06	-	-	-	-
<b>R4</b>	4,11	0,12	-	-	-	-
<b>R5</b>	9,11	0,31	-	-	-	-
<b>D1</b>	<LOQ	426,71	-	-	-	-
<b>D2</b>	<LOQ	484,21	-	-	-	-
<b>D3</b>	<LOQ	552,60	-	-	-	-
<b>D4</b>	<LOQ	605,80	-	-	-	-
<b>D5</b>	<LOQ	665,86	-	-	-	-
<b>M1</b>	<LOQ	423,74	-	-	-	-
<b>M2</b>	<LOQ	650,60	-	-	-	-
<b>M3</b>	<LOQ	435,00	-	-	-	-
<b>M4</b>	<LOQ	667,29	-	-	-	-
<b>M5</b>	<LOQ	421,60	-	-	-	-
<b>M6</b>	<LOQ	647,10	-	-	-	-

Os dados se ajustaram tanto ao modelo AI ( $\chi^2=181,77$ , soma dos quadrados dos resíduos (SS) = 57,39, teste da razão de verossimilhança ( $p(\chi^2)$ ) <0,001, e  $r^2= 0,76$ ) quanto ao modelo AC ( $\chi^2 = 207,43$ , SS = 31,72,  $p(\chi^2)$  <0,001, e  $r^2 = 0,86$ ). Assim, o modelo AI foi selecionado para descrever o efeito da mistura de fipronil e 2,4-D, pois ele é utilizado para modelar mistura de substâncias com diferentes modos de ação, o qual é o caso de 2,4-D e fipronil (herbicida e inseticida, respectivamente). Estender o modelo AI para descrever S/A melhorou significativamente o ajuste do modelo ( $\chi^2 = 30,00$ , SS = 27,38,  $r^2 = 0,88$ , e  $p(\chi^2)$  <0,001) e o efeito sinérgico foi detectado ( $a = -5,51$ ). DR diminuiu significativamente o SS ( $\chi^2 = 32,47$ , SS = 24,91,  $r^2 = 0,89$  e  $p(\chi^2)$  <0,001), assim o efeito antagonístico ( $a = 2,61$ ) apareceu quando o efeito da mistura resultou principalmente do fipronil. Entretanto, o sinergismo ( $b_{DR} = -20,70$ ) foi indicado quando o efeito da mistura foi causado principalmente por 2,4-D. Alinhados com esses resultados, LICHTENSTEIN; LIANG e ANDEREGG (1973) mostraram que muitos herbicidas, incluindo o i.a. 2,4-D, aumentaram a toxicidade de muitos inseticidas à insetos (larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762; *Musca domestica* Linnaeus 1758.; e *Drosophila melanogaster* Meigen 1830). DL melhorou o

modelo AI ( $\chi^2 = 39,26$ ,  $SS = 18,12$ ,  $r^2 = 0,92$  e  $p(\chi^2) < 0,001$ ), indicando antagonismo em baixos níveis de concentrações e sinergismos em altos níveis de concentração ( $a = 12,39$ ). A mudança do antagonismo para o sinergismo ocorreu em menores níveis de concentrações que a  $CE_{50}$  ( $b_{DL} = 4,63$ ) (Figura 35). Mais detalhes da análise do MIXTOX estão na Tabela 9.



**Figura 35.** Isoblograma da mortalidade de *Notodiaptomus iheringi* exposto as misturas de fipronil (Regent 800® WG) e 2,4-D (DMA 806® BR). Os dados foram modelados pelos modelos de ação independente/ *independent action* (AI) estendido ao desvio dependente do nível de dose/dose level-dependent (DL). As formas côncavas representam o sinergismo e as convexas o antagonismo. Os números sobre as formas representam a razão de mortalidade modelada dos copépodos pelos modelos de desvios.

**Tabela 9.** Análise MIXTOX dos efeitos da mistura do fipronil (Regent 800® WG) e 2,4-D (DMA 806® BR) na mortalidade de *Notodiptomus iheringi* durante 48 h. Ref = referência; AI = modelo de ação independente/ *independent action*; AC = modelo de adição de concentração/ *concentration addition*; S/A = sinergismo/antagonismo/ *synergism/antagonism*; DL = desvio dependente de nível de dose/ *dose level-dependent da referência*; DR = desvio dependente da razão de dose/ *dose ratio-dependent da referência*; Max é o máximo valor de resposta;  $\beta$  = é a inclinação da curva dose-resposta individual; CE<sub>50</sub> = a concentração de efeito mediano; a, b<sub>DR</sub> e b<sub>DL</sub> = parâmetros na função de desvio; SS = soma do quadrado dos resíduos; r<sup>2</sup> = coeficiente de regressão;  $\chi^2$  = a estatística de teste; df = graus de liberdade.; p( $\chi^2$ ) = o resultado do teste de razão de verossimilhança.

	Ação independente				Adição de concentração			
	Ref (AI)	S/A	DR	DL	Ref (AC)	S/A	DR	DL
<b>Max</b>	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
<b><math>\beta</math> fipronil</b>	3,45	3,77	3,60	3,37	3,82	4,29	3,99	3,38
<b><math>\beta</math> 2,4-D</b>	5,35	6,81	7,14	5,49	6,29	6,68	6,78	5,44
<b>CE<sub>50</sub> - fipronil (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	2,94	3,41	3,50	3,53	3,50	3,38	3,46	3,53
<b>CE<sub>50</sub> - 2,4-D (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>	500,83	548,85	548,48	543,89	550,25	550,23	549,97	548,50
<b>a*</b>	-	-5,51	2,61	12,39	-	0,32	1,96	59,81
<b>b<sub>DR/DL</sub>*</b>	-	-	-20,70	4,63	-	-	-4,36	0,79
<b>SS</b>	57,39	27,38	24,91	18,12	31,72	31,21	30,00	18,07
<b>r<sup>2</sup></b>	0,76	0,88	0,89	0,92	0,86	0,86	0,87	0,92
<b><math>\chi^2</math></b>	181,77	30,00	32,47	39,26	207,43	0,51	1,71	13,64
<b>Df</b>	-	1	2	2	-	1	2	2
<b>p(<math>\chi^2</math>)</b>	3,10 x 10 <sup>-38</sup>	4,30 x 10 <sup>-8</sup>	8,90 x 10 <sup>-8</sup>	2,97 x 10 <sup>-9</sup>	9,44 x 10 <sup>-44</sup>	0,47	0,42	0,001

\*Interpretação dos parâmetros para cada desvio baseado em JONKER *et al.* (2005):

S/A: a>0 = antagonismo; e a<0 = sinergismo.

DR: a>0 = antagonismo, exceto para proporções de mistura onde um valor negativo significativo de b<sub>DR</sub> (químico 1/ fipronil) indique sinergismo; a<0 = sinergismo, exceto para proporções de mistura onde um valor positivo significativo de b<sub>DR</sub> (químico 1/ fipronil) indique antagonismo; b<sub>DR</sub>(químico 1/ fipronil) >0 = antagonismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo químico 1/fipronil; e b<sub>DR</sub> (químico 1/ fipronil) <0 = sinergismo onde a toxicidade da mistura é principalmente causada pelo químico 1/fipronil.

DL: a>0 = antagonismo em baixo nível de dose e sinergismo em alto nível de dose; a<0 = sinergismo em baixo nível de dose e antagonismos em alto nível de dose; No modelo de ação independente (AI) - quando b<sub>DL</sub> >2, mudanças ocorrem em nível de dose menor que o CE<sub>50</sub>/ quando b<sub>DL</sub> = 2, mudanças ocorrem em nível da CE<sub>50</sub>/ quando 1 < b<sub>DL</sub> < 2, mudanças ocorrem em nível de dose maior que a CE<sub>50</sub>/ e quando b<sub>DL</sub> < 1, nenhuma mudança ocorre, mas a magnitude do sinergismos/antagonismos é dependente do nível do efeito. No modelo de adição de concentração (AC) - quando b<sub>DL</sub> > 1, mudanças ocorrem em nível de dose menor que o CE<sub>50</sub>/ quando b<sub>DL</sub> = 1, mudanças ocorrem no nível da CE<sub>50</sub>/ quando 0 < b<sub>DL</sub> < 1, mudanças ocorrem em níveis de dose maior que a CE<sub>50</sub>/ e quando b<sub>DL</sub> < 0, nenhuma mudança, mas a magnitude do sinergismos/antagonismos é dependente do nível de dose.

Poucos estudos avaliaram o efeito agudo de misturas de agrotóxicos em copépodos. LEGRAND *et al.* (2017) encontraram efeitos sinérgicos da mistura dos inseticidas clordecona (3,75 – 221,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e piriproxifeno (2,50 – 150,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) na mortalidade de machos de *E. affinis*. FORGET *et al.* (1999) mostraram sinergismo na mortalidade de fêmeas ovadas de *T. brevicornis* (Haparticoida) quando expostas a

misturas dos inseticidas diclorovós e malation. Até o atual conhecimento, nenhum estudo avaliou os efeitos agudos da mistura de 2,4-D e fipronil em copépodos. Porém, esta mistura já indicou efeitos antagônicos na mortalidade do anfípoda *Hyaletta meinerti* Stebbing 1899 (fipronil: 0,20 – 0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 2,4-D: 29 - 426  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (DA SILVA PINTO *et al.*, 2021). Ainda, como os resultados deste estudo na mortalidade de *N. iheringi* (antagonismo em doses mais baixas e sinergismo em doses mais altas), SILVA *et al.* (2020) obteve o mesmo resultados para *C. silvestrii* (fipronil: 0,80 – 13,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 2,4-D: 100 - 225  $\text{mg L}^{-1}$ ). Os efeitos das interações de diferentes agrotóxicos em mistura pode mudar de espécie para espécie conforme a duração da exposição, a rota de exposição, níveis das doses, e dependendo do organismo alvo (HERNÁNDEZ; GIL; LACASAÑA, 2017). Por exemplo, PINTO *et al.* (2021) não encontraram efeitos agudos da mistura de fipronil (0,3 – 3,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e 2,4-D (29 - 426  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) na mortalidade do inseto *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino 1981, porém, no crescimento, a mistura apresentou efeitos antagônicos em baixas doses e sinérgicos em altas doses; *Danio rerio* Hamilton-Buchanan 1822 não apresentou efeito agudo na mortalidade devido a mistura nas concentrações de 63,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fipronil e 447  $\mu\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D, mas aumentou as lesões histopatológicas nas brânquias, e efeitos sinérgicos e antagônicos à níveis bioquímicos (VIANA *et al.*, 2022).

Como indicado por CEDERGREEN (2014) efeitos sinérgicos causados por mistura de agrotóxicos são dose dependentes e eles são mais observados em altas concentrações (no intervalo de  $\mu\text{g L}^{-1}$  à  $\text{mg L}^{-1}$ ). Os dados desse estudo estão de acordo com esta afirmação, já que fipronil e 2,4-D estão em unidades de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente. Contudo, no Brasil, 2,4-D e fipronil são aplicados nos cultivos ao mesmo período (ADAPAR, 2020a, b), e eles podem ocorrer juntos em picos de concentrações de  $\mu\text{g L}^{-1}$  em águas superficiais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; DE CASTRO LIMA *et al.*, 2020). O fipronil já foi relatado em concentrações entre 0,05 e 26,20  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016); e 2,4-D entre 2,62 e 88,73  $\mu\text{g L}^{-1}$  (DE CASTRO LIMA *et al.*, 2020) em águas superficiais. Portanto, interações preocupantes, como as sinérgicas, tem baixa probabilidade de ocorrerem no ambiente, porque a  $\text{CE}_{50}$  de fipronil para *N. iheringi* pode ser encontrado no ambiente, mas a  $\text{CE}_{50}$  do 2,4-D não. Entretanto, em situações de más práticas de aplicação ou acidentes envolvendo agrotóxicos, levando a um pico das concentrações dessas substâncias, o sinergismo pode



ocorrer. As informações aqui apresentadas aumentam o conhecimento em relação às interações do fipronil e 2,4-D para estudos ecotoxicológicos.

### 6.3.3 Testes de pós-exposição

Para o fipronil, nos três testes os tratamentos Cr, R1, R2, R3 e R4 alcançaram o número mínimo de organismos sobreviventes para a realização do teste pós-exposição. As percentagens de mortalidade de copépodos no primeiro teste de pós-exposição foram: Cr= 0%, R1= 9,09%, R2= 0%, R3= 0% e R4= 27,27%. A análise de GLM não apresentou diferenças significativas na mortalidade entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). Para o segundo e terceiro teste a mortalidade foi 0% para todos os tratamentos. Assim, nenhuma estatística foi aplicada para esses testes. Para 2,4-D, dez organismos sobreviventes foram utilizados por tratamento para o: primeiro teste - Cd, D1, D2, D3, e D4; segundo teste - Cd e D1; e terceiro teste - Cd, D1, D2, e D3. Em todos os tratamentos a mortalidade de copépodos foi de 0%, com exceção do tratamento D3, que apresentou uma mortalidade de 9,09% no primeiro teste. Pela mesma razão dos testes pós-exposição de fipronil, nenhuma estatística foi aplicada. Corroborando com esses resultados, VAN GEEST *et al.* (2014) observaram a recuperação de náuplios, de copepoditos e de adultos de *A. hudsonica* Pinhey 1926 (Calanoida) em um teste de pós-exposição (3-5 h) após a exposição durante 1 h a deltametrina, cipermetrina e peróxido de hidrogênio. Porém, MEDINA *et al.* (2004) mostraram um aumento na mortalidade de *A. tonsa* ao longo do tempo (144 h) em um teste de pós-exposição depois do contato com cipermetrina durante 1 h.

Os agrotóxicos são conhecidos por serem prejudiciais e desencadearem diferentes respostas além da mortalidade nos organismos; *i.e.*, na reprodução (SILVA *et al.*, 2020), na bioquímica (VIANA *et al.*, 2022), no comportamento (MOREIRA *et al.*, 2021), no crescimento (PINTO *et al.* 2021), etc. Mesmo quando os copépodos se recompõem da exposição e não há efeito letal, os efeitos tóxicos dos contaminantes podem persistir. Impactos na ingestão de alimento em testes de pós-exposição a agrotóxicos foram mostrados para as espécies *A. hudsonica* durante 3-5 h (VAN GEEST *et al.*, 2014), *D. magna* e *Diaphanosoma brachyurum* Liévin 1848 durante 4 h (LOPES *et al.*, 2007). Não obstante, nesse estudo a análise GLM não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos e o controle na TA ( $p >0.05$ ). Os valores das médias e dos desvios padrão da

TA (mL copépodo<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) dos três testes para cada tratamento foram: Cr= 0,25 ±0,40, R1= 0,26 ±0,70, R2= 0,43 ±0,374, R3= 0,44 ±0,48, R4= 0,45 ±0,40, Cd= 0,41 ±1,12, D1 = 0,42 ±1,14, D2= -0,01 ±0,43, D3= 0,14 ±0,25 e D4= 0,40 ± ,40 (mais detalhes na Tabela 10).

**Tabela 10.** Valores das médias e dos desvios padrão (DP) da taxa de alimentação (TA) de *Notodiptomus iheringi* do teste de pós-exposição de Fipronil (Regent 800<sup>®</sup> WG) e 2,4-D (DMA 806<sup>®</sup> BR). 1, 2 e 3 são cada um dos testes de pós-exposição realizados com cada um dos agrotóxicos. Tratamentos (T) estão representados na tabela como a concentração nominal. Para Fipronil: Cr) controle sem fipronil; R1) 1,5 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; R2) 3 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; R3) 6 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; R4) 12 µg L<sup>-1</sup> de fipronil; e R5) 24 µg L<sup>-1</sup> de fipronil. Para 2,4-D: Cd) controle sem 2,4-D; D1) 420 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; D2) 480 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; D3) 540 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; D4) 600 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; e D5) 660 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. “-“significa que nenhum teste foi desenvolvido com esse tratamento. Valores negativos de taxa de alimentação foram interpretados como zero/nenhuma ingestão (NEJSTGAARD; GISMERVIK; SOLBERG, 1997).

Teste	Fipronil			Teste	2,4-D		
	T	TA			T	TA	
		Média	DP			Média	DP
1	Cr	0,34	±0,52	1	Cd	-0,18	±0,17
	R1	0,30	±0,73		D1	-0,07	±0,56
	R2	0,67	±0,54		D2	0,07	±0,36
	R3	0,66	±0,80		D3	0,26	±0,10
	R4	0,85	±0,39		D4	-0,60	±0,40
	R5	-	-		D5	-	-
2	Cr	0,23	±0,18	2	Cd	1,40	±1,64
	R1	-0,08	±0,74		D1	0,87	±1,42
	R2	0,48	±0,21		D2	-	-
	R3	0,43	±0,27		D3	-	-
	R4	0,19	±0,17		D4	-	-
	R5	-	-		D5	-	-
3	Cr	0,18	±0,57	3	Cd	-0,06	±0,14
	R1	0,56	±0,75		D1	-0,63	±0,47
	R2	0,14	±0,04		D2	-0,09	±0,55
	R3	0,22	±0,24		D3	0,02	±0,33
	R4	0,31	±0,27		D4	-	-
	R5	-	-		D5	-	-

*N. iheringi* (do presente estudo) originou de cultivos estabelecidos, como *A. tonsa* no estudo de MEDINA *et al.* (2004) e *D. magna* no de LOPES *et al.* (2007). Entretanto, *A. tonsa* apresentou uma toxicidade retardada na mortalidade após 24 h em um teste de pós-exposição com duração de 144 h, e embora *D. magna* diminuiu a ingestão de alimento depois de 4 h, Cladocera em relação a Copepoda pode apresentar diferentes respostas, pois pertencem a diferentes grupos (KULKARNI *et al.*, 2013). Ainda, em relação à *A. hudsonica* (VAN GEEST *et al.*, 2014) e *D. brachyurum* (LOPES *et al.*, 2007), os mesmos

foram coletados do ambiente e aclimatados antes dos testes por 48 h e 24 h, respectivamente, porém o tempo de aclimação pode afetar na resposta do organismo. Se esse tempo não for o suficiente, o organismo pode se tornar mais sensível ao contaminante (LOPES *et al.*, 2021). Portanto, testes de pós-exposição com maior duração poderiam ser mais sensíveis para *N. iheringi* devido à toxicidade retardada, por isso deveriam ser testados.

#### 6.3.4 Conclusão

O fipronil pode causar efeito letal agudo em *N. iheringi* em concentrações ambientais nas águas superficiais brasileiras. Fipronil e 2,4-D, em todas as concentrações testadas, provocaram deformações morfológicas nos copépodos. Na maior concentração testada de fipronil, fungos filamentosos colonizaram/cobriram os organismos mortos. A mistura desses dois agrotóxicos pode desencadear sinergismo na mortalidade de *N. iheringi* em concentrações altas (concentrações reais ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em 48 h:  $1,81 \pm 0,26$  (R1) à  $7,43 \pm 2,78$  R5  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $408,05 \pm 31,93$  (D1) à  $630,30 \pm 45,52$  (D5)) antes de atingirem a  $\text{CE}_{50}$ . Os testes de pós-exposição não resultaram em diferenças significativas na mortalidade e na TA durante 4 h entre os tratamentos e o controle. Entretanto, um retardo da toxicidade ao efeito dos agrotóxicos pode acontecer, assim testes de pós-exposição com uma duração maior que 4 h com *N. iheringi* devem ser realizados.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos experimentos em mesocosmos do Capítulo 1 demonstraram que os agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em misturas, não alteraram as variáveis limnológicas avaliadas na presente pesquisa. Entretanto, quando consideramos que os ecossistemas aquáticos contêm outros compostos químicos, como os metais, foi possível verificar modificações nas concentrações desses compostos nos mesocosmos contaminados com agrotóxicos. Muitos dos metais aqui analisados já estavam nos ecossistemas antes da contaminação com 2,4-D e fipronil, sendo que alguns deles, como o Al, por exemplo, são resultados das próprias características geológicas local. Por outro lado, o Ba aumentou a concentração nos sistemas como resultado da introdução dos

agrotóxicos. Sabe-se que os produtos técnicos e as formulações comerciais de agrotóxicos podem conter metais em suas composições (COX; SURGAN, 2006; DEFARGE; SPIROUX DE VENDÔMOIS; SÉRALINI, 2018; IBAMA, 2019b; US EPA, 2022), e este pode ser o caso do Ba.

Em relação a interação entre os metais e as variáveis abióticas, as análises mostraram que a ressuspensão do sedimento devido à ação do vento é um componente importante na dinâmica desses elementos nos ecossistemas aquáticos, como a reintrodução de metais e a imobilização deles ao sedimento. Verificou-se, ainda, que houve a interação entre as formulações comerciais e metais. Neste estudo foram analisadas apenas as interações de dois agrotóxicos (os quais são bastante utilizados nos cultivos de cana-de-açúcar no estado de São Paulo) com variáveis abióticas e metais selecionados. Porém, os ecossistemas aquáticos apresentam uma grande complexidade em que há a presença de uma mistura química derivada da própria geoquímica (CBH DO TIETÊ, 2019; LEITE; WENDLAND; GASTMANS, 2021), como também da introdução por atividades antrópicas como a agricultura, a qual utiliza uma diversidade de agrotóxicos para diferentes cultivos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; CBH DO TIETÊ-JACARÉ- COMITÊS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO TIETÊ-JACARÉ, 2019; CEDERGREEN, 2014).

Os resultados do Capítulo 2 reforçam o conceito da integração de análises das variáveis físicas e químicas em conjunto com as análises das variáveis biológicas em estudos de impactos dos contaminantes/agrotóxicos em ambientes aquáticos (FINNEGAN *et al.*, 2018; HANAZATO, 2001; RESENDE, 2015), pois enquanto nas análises físicas, químicas, clorofila e nutrientes, estes não apresentaram modificações devido a introdução dos agrotóxicos nos mesocosmos (com exceção dos metais), as variáveis biológicas demonstraram efeitos direto da toxicidade do fipronil e da mistura de 2,4-D e fipronil. Ressalta-se que a análise de metais nem sempre é realizada em estudos ecotoxicológicos em mesocosmos com agrotóxicos. Além disso, quando dividimos o zooplâncton em grupos foi possível avaliar respostas diferentes aos agrotóxicos, em que Cladocera e Copepoda foram os mais sensíveis aos efeitos tóxicos diretos de fipronil e a mistura de 2,4-D+fipronil em relação a Rotífera. Dentro dos ecossistemas aquáticos existe um conjunto enorme de espécies de diversos grupos taxonômicos interagindo entre si e com o próprio ambiente (ESTEVEES, 1998; WETZEL, 2001), em que algumas são mais

sensíveis e outras mais tolerantes (HANAZATO, 1998, 2001; NOVELLI, 2010; PEREIRA *et al.*, 2018; RESENDE, 2015). Esta divisão também permitiu o conhecimento de efeitos indiretos na estrutura da comunidade zooplanctônica, como modificações na rede trófica, nas interações biológicas e efeitos de *bottom-up* (CARPENTER; KITCHELL; HODGSON, 1985; HANAZATO, 2001).

À nível de grandes grupos, o fipronil, isolado e em mistura, alterou a composição e a estrutura da comunidade zooplanctônica, em que provavelmente vai ocorrer uma perda na eficiência da transferência de energia de um nível trófico para outro, devido ao encurtamento da cadeia trófica, pela perda dos grupos Cladocera e Copepoda. Os sistemas de mesocosmos foram mais operados por efeitos de *bottom-up*, em que as alterações nos nutrientes e biomassa fitoplanctônica alteraram as variáveis físicas e químicas e as interações biológicas do ecossistema aquático. As principais interações biológicas comprometidas pela aplicação dos agrotóxicos foram: *i) nos ecossistemas contaminados com fipronil e fipronil+2,4-D*: devido à supressão da população de Cladocera e Copepoda, houve a diminuição pela competição por recursos alimentares como o fitoplâncton e conseqüentemente o aumento e a ocupação dos nichos pelo grupo de rotíferos (que contém espécies mais tolerantes e oportunistas à impactos por agrotóxicos); e *ii) nos mesocosmos contaminados com 2,4-D*: não houve efeitos tóxicos diretos, como nos mesocosmos contaminados com fipronil, porém houve o aumento da população de copépodos e a diminuição das populações de cládóceros (a qual não foi significativa) e principalmente a diminuição da população de rotíferos, isto pode ser devido a uma maior pressão competitiva pelas microalgas, como também devido a efeitos crônicos na desregulação endócrina e reprodutiva desses organismos. Sabe-se que 2,4-D e outros herbicidas são conhecidos por serem desreguladores endócrinos (RICO-MARTÍNEZ *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2020).

Durante o experimento houve a comprovação de que os organismos zooplanctônicos estão suscetíveis a efeitos sinérgicos por meio da interação entre as variáveis físicas e químicas e os agrotóxicos. Esta resposta apareceu nas análises do grupo de Copepoda, em que a interação entre os tratamentos e as variáveis abióticas da PC3 do subconjunto (a variável que mais contribui foi o OD, o qual apresentou baixos valores durante todo o experimento, e apresenta variação diária em suas concentrações em ecossistemas aquático rasos) diminuiu significativamente a abundância dos copépodos.

Vale ressaltar sobre a persistência do efeito tóxico de fipronil, isolado e em mistura com 2,4-D, já que não houve a recuperação da população de cladóceros e copépodos durante os 73 d de experimento. Este resultado vai contra o esperado, pois em ambientes tropicais acredita-se que devido às temperaturas mais quentes, e alta umidade haverá uma maior taxa de dissipação dos agrotóxicos, conseqüentemente um menor tempo em que os organismos aquáticos serão expostos a esses contaminantes, permitindo uma recuperação mais rápida da comunidade (SANCHEZ-BAYO; HYNE, 2011). Isto revela a complexidade dos ecossistemas aquáticos, em que há a interação entre uma diversidade de variáveis abióticas e bióticas em conjunto com os contaminantes. Além disso, o ciclo do cultivo da cana-de-açúcar é dividido em quatro períodos, sendo eles o estabelecimento (média de 10 à 30 d), o perfilhamento (média de 150 à 350 d), o crescimento dos colmos (média de 180 à 330 d) e a maturação (média de 50 à 70 d) (OLIVEIRA; BRAGA, 2011). A frequência de aplicação de agrotóxicos acontece ao longo desse ciclo, seja em épocas chuvosas ou em épocas secas, podendo ser na pré-emergência ou na pós-emergência de plantas daninhas, para 2,4-D (DMA<sup>®</sup> 806 BR), com aplicações máximas de duas vezes por ciclo de cultura e um intervalo de segurança de três meses após o plantio ou o corte (ADAPAR, 2020a); enquanto para fipronil (Regent<sup>®</sup> 800 WG), o número máximo de aplicações depende do estágio de crescimento e também do tipo de praga/alvo biológico e não existe um intervalo de segurança determinado para a aplicação deste composto, já que se trata de um tratamento de solo (ADAPAR, 2020b). Assim, conforme nossos resultados, 73 d é um período curto para a recuperação da comunidade zooplânctônica atingida por concentrações de fipronil, isolado e em mistura com 2,4-D, e conforme as recomendações na bula e o longo ciclo da cana-de-açúcar é provável que o ecossistema aquático não terá tempo o suficiente para se recompor até receber uma nova dose da concentração desses agrotóxicos. O ecossistema será exposto continuamente ao estresse e pode ser que não consiga mais se recuperar. Assim, os efeitos dos impactos no ecossistema aquático devido a mais doses desses agrotóxicos devem ser investigados.

O Capítulo 3 traz informações sobre a toxicidade desses agrotóxicos, isolados e em mistura, a espécie *N. iheringi*. Como outras espécies de copépodos, *N. iheringi* também se mostrou sensível ao Fipronil e 2,4-D. Porém, estudos com copépodos são escassos, mesmo existindo informações sobre o papel relevante desses organismos na

estrutura da comunidade aquática. Assim, mais testes com espécies chave de copépodos (como o *N. iheringi* é no estado de São Paulo) podem trazer informações relevantes em relação ao impacto dos agrotóxicos e outros contaminantes na estrutura e também no funcionamento dos ecossistemas aquáticos. Comparando os resultados do Capítulo 2 com o Capítulo 3, os efeitos tóxicos dos tratamentos com fipronil e 2,4-D+Fipronil na comunidade de Copepoda estão alinhados com a sensibilidade de *N. iheringi*. A  $CL_{50-48h}$  de fipronil ( $4,97 \pm 3,30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para *N. iheringi* foi 12,87 vezes menor do que a concentração nominal aplicada nos mesocosmos com esse contaminante ( $64 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e a  $CL_{50-48h}$  ( $478,24 \pm 107 \text{mg L}^{-1}$ ) de 2,4-D para *N. iheringi* foi 1057,52 vezes maior que a concentração nominal aplicada nos mesocosmos ( $452 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Em relação à mistura, comparando as concentrações utilizadas nos mesocosmos com as obtidas em laboratório, nos mesocosmos a concentração de 2,4-D foi muito mais tóxica a comunidade de Copepoda, pois as concentrações utilizadas em laboratório foram bem maiores. Segundo os dados em laboratório, os efeitos antagônicos apareceram quando o efeito da mistura resultou principalmente do fipronil, enquanto o sinergismo foi indicado quando o efeito da mistura foi causado principalmente por 2,4-D. Nos mesocosmos o efeito sinérgico parece ser resultado da maior concentração utilizada de fipronil, contrariando o que foi encontrado em laboratório. Porém, no ambiente natural, existem muitas outras variáveis interagindo com a comunidade aquática, sendo um ambiente muito mais complexo.

A partir dos resultados encontrados nos três capítulos dessa tese, muitas informações importantes sobre os efeitos dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D às variáveis limnológicas, à comunidade dos grandes grupos do zooplâncton, e ao copépodo *N. iheringi* foram destacadas, contribuindo para o maior conhecimento em relação à dinâmica e a toxicidade dos agrotóxicos amplamente utilizados em cultivos de cana-de-açúcar nos ecossistemas naturais, e em laboratório às espécies chaves do ecossistema aquático. Essas informações são importantes para a tomada de decisões em relação ao manejo e o estabelecimento do limite das concentrações de agrotóxicos nos cultivos de cana-de-açúcar para a proteção e sustentabilidade dos ecossistemas aquáticos. Porém, ainda há muitas lacunas que precisam ser preenchidas e estudadas, como, por exemplo:

- 1) avaliar os efeitos da frequência de aplicação dos agrotóxicos nos cultivos nos ecossistemas aquáticos;

- 2) analisar a comunidade do zooplâncton em níveis mais específicos para encontrar mudanças mais sensíveis, como as dos grupos funcionais;
- 3) realizar experimentos focados no metabolismo desses ambientes;
- 4) avaliar a capacidade de autodepuração e os efeitos nas comunidades microbianas;
- 5) em laboratório avaliar os efeitos agudos nos demais estágios de desenvolvimento de *N. iheringi*, bem como as diferenças na sensibilidade entre fêmeas e machos dos copépodos;
- 6) avaliar os efeitos crônicos na reprodução, no desenvolvimento e no comportamento de *N. iheringi* expostos a fipronil, 2,4-D, isolados e em mistura.



## 8 REFERÊNCIAS

- ABDALLAH ALNUWAISER, M. An analytical survey of trace heavy elements in insecticides. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2019, p. e8150793, 2019.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373:2016. **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017.
- ADAPAR - AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Bula DMA® 806 BR**, 2020a. Disponível em: <[https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-11/dma\\_806\\_br\\_2011.pdf](https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-11/dma_806_br_2011.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2022.
- ADAPAR - AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Bula Regent® 800 WG**, 2020b. Disponível em: <[/www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos\\_restritos/files/documento/2021-01/regent800wg.pdf](https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2021-01/regent800wg.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2022.
- AGROFIT -MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Consulta de Ingrediente Ativo**. Governo brasileiro. Disponível em: <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 29 jul. 2022.
- AL-AIDAROOS, A. M.; MANTHA, G. First report of tumor-like anomalies on the copepods and their seasonality from the Obhur Creek, Jeddah Coast, Central Red Sea. **Journal of Ocean University of China**, v. 17, n. 3, p. 659–666, 1 jun. 2018.
- ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A. J. A.; MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.

- ALEMAYEHU, D.; HACKETT, F. Water quality and trophic state of Kaw Lake. **Journal of Environmental Studies**, v. 2, n. 1, p. 7, 2016.
- ALEXANDER, H. C.; GERSICH, F. M.; MAYES, M. A. Acute toxicity of four phenoxy herbicides to aquatic organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 314–321, 1 jul. 1985.
- ALVARADO-FLORES, J.; ARZATE-CÁRDENAS, M. A.; PÉREZ-YAÑEZ, D.; CEJUDO, E. Environmental stressor induces morphological alterations in zooplankton. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 50, n. 1, p. 1–12, 28 fev. 2022.
- BARNETT, A. J.; FINLAY, K.; BEISNER, B. E. Functional diversity of crustacean zooplankton communities: towards a trait-based classification. **Freshwater Biology**, v. 52, n. 5, p. 796–813, 2007.
- BASAK, R.; WAHID, K. A.; DINH, A. Estimation of the chlorophyll-a concentration of algae species using electrical impedance spectroscopy. **Water**, v. 13, n. 9, p. 1223, 2021.
- BEISNER, B. E.; PERES-NETO, P. R. Seasonal trophic dynamics affect zooplankton community variability. **Freshwater Biology**, v. 54, n. 11, p. 2351–2363, 2009.
- BEVERIDGE, A.; PICKERING, W. F. The influence of surfactants on the adsorption of heavy metal ions by clays. **Water Research**, v. 17, n. 2, p. 215–225, 1983.
- BHATERIA, R.; JAIN, D. Water quality assessment of lake water: a review. **Sustainable Water Resources Management**, v. 2, n. 2, p. 161–173, 2016.
- BLINDOW, I.; HARGEBY, A.; HILT, S. Facilitation of clear-water conditions in shallow lakes by macrophytes: differences between charophyte and angiosperm dominance. **Hydrobiologia**, v. 737, n. 1, p. 99–110, 2014.
- BOBÉ, A.; MEALLIER, P.; COOPER, J.-F.; COSTE, C. M. Kinetics and mechanisms of abiotic degradation of fipronil (hydrolysis and photolysis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2834–2839, 1998.

- BOLKER, B. M.; BROOKS, M. E.; CLARK, C. J.; GEANGE, S. W.; POULSEN, J. R.; STEVENS, M. H. H.; WHITE, J.-S. S. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 3, p. 127–135, 2009.
- BONECKER, C. C.; AOYAGUI, A. S. M. Relationships between rotifers, phytoplankton and bacterioplankton in the Corumbá reservoir, Goiás State, Brazil. *Em*: HERZIG, A.; GULATI, R. D.; JERSABEK, C. D.; MAY, L. **Rotifera X: Rotifer Research: Trends, New Tools and Recent Advances, Proceedings of the Xth International Rotifer Symposium, held in Illmitz, Austria, 7–13 June 2003**. Developments in Hydrobiology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2005. p. 415–421.
- BROWN, N. E. M.; THERRIAULT, T. W.; HARLEY, C. D. G. Field-based experimental acidification alters fouling community structure and reduces diversity. **Journal of Animal Ecology**, v. 85, n. 5, p. 1328–1339, 2016.
- CARPENTER, S. R.; KITCHELL, J. F.; HODGSON, J. R. Cascading trophic interactions and lake productivity. **BioScience**, v. 35, n. 10, p. 634–639, 1985.
- CASTAÑO-SÁNCHEZ, A.; PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, F. J. M.; REBOLEIRA, A. S. P. S. Sensitivity of a widespread groundwater copepod to different contaminants. **Chemosphere**, v. 274, p. 129911, 2021.
- CASTILHO, M. C. A. **O papel da comunidade zooplanctônica em estados limnológicos alternativos em uma lagoa rasa**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, 2018.
- CASTILHO-NOLL, M. S. M.; CÂMARA, C. F.; CHICONE, M. F.; SHIBATA, É. H.; STEPHAN, L. R. Copepods (Crustacea, Maxillopoda) from shallow reservoirs. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 24, p. 149–159, 2012.
- CBH DO TIETÊ-JACARÉ- COMITÊS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO TIETÊ-JACARÉ. **Relatório de situação dos recursos hídricos 2019: UGRHI 13 - Bacia hidrográfica Tietê- Jacaré (Ano base 2018)**. Comitês da Bacia

Hidrográfica do Tietê-Jacaré, 2019. Disponível em: <<https://dspace.ana.gov.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/9462/Relatorio%20situacao%202019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

CEDERGREEN, N. Quantifying Synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. **PLOS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96580, 2014.

CEDERGREEN, N.; MADSEN, T. V. Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. **New Phytologist**, v. 155, n. 2, p. 285–292, 2002.

CHANDLER, G. T.; CARY, T. L.; VOLZ, D. C.; WALSE, S. S.; FERRY, J. L.; KLOSTERHAUS, S. L. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 117–124, 2004.

CHARLSON, R. J.; RODHE, H. Factors controlling the acidity of natural rainwater. **Nature**, v. 295, n. 5851, p. 683–685, 1982.

CHATON, P. F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M.; MEYRAN, J. C. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding sites. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 1, p. 8–12, 2002.

CIBIC, T.; BONGIORNI, L.; BORFECCHIA, F.; DI LEO, A.; FRANZO, A.; GIANDOMENICO, S.; KARUZA, A.; MICHELI, C.; ROGELJA, M.; SPADA, L.; DEL NEGRO, P. Ecosystem functioning approach applied to a large contaminated coastal site: the study case of the mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 13, p. 12739–12754, 2016.

COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the gaba-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, n. 1, p. 47–54, 1993.

- CONLEY, D. J.; SCHELSKE, C. L.; STOERMER, E. F. Modification of the biogeochemical cycle of silica with eutrophication. **Marine Ecology Progress Series**, v. 101, p. 179–192, 1993.
- CONNORS, K. A.; BRILL, J. L.; NORBERG-KING, T.; BARRON, M. G.; CARR, G.; BELANGER, S. E. *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* have similar sensitivity in standard acute and chronic toxicity tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 134–147, 2022.
- COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803–1806, 2006.
- CRAWFORD, S. A. Chemical, physical and biological changes associated with chara succession in farm ponds. **Hydrobiologia**, v. 55, n. 3, p. 209–217, 1977.
- DA SILVA, L. C. **A comunidade zooplanctônica de rios amazônicos na área de influência da Usina Hidrelétrica de Santo Antônio do Madeira, RO: diferentes abordagens no monitoramento**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2015.
- DA SILVA PINTO, T. J.; MOREIRA, R. A.; DA SILVA, L. C. M.; YOSHII, M. P. C.; GOULART, B. V.; FRAGA, P. D.; DA SILVA ROLIM, V. L.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. Toxicity of fipronil and 2,4-D formulations (alone and in a mixture) to the tropical amphipod *Hyaella meinerti*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 28, p. 38308–38321, 2021.
- DA SILVA SANTOS, A.; SIMÕES, F. R.; CODOGNOTO, L.; VALLE, E. M. A. Study of the interaction cu(ii) - carbendazim in natural waters by electrochemical techniques. **Chemosphere**, v. 255, p. 127013, 2020.
- DANTAS, Ê. W.; ALMEIDA, V. L. dos S.; BARBOSA, J. E. de L.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. do C.; MOURA, A. do N. Efeito das variáveis abióticas e do

fitoplâncton sobre a comunidade zooplantônica em um reservatório do Nordeste brasileiro. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 99, p. 132–141, 2009.

DE CASTRO LIMA, J. A. M.; LABANOWSKI, J.; BASTOS, M. C.; ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; DE VARGAS, J. P. R.; MONDAMERT, L.; GRANADO, E.; TIECHER, T.; ZAFAR, M.; TROIAN, A.; LE GUET, T.; DOS SANTOS, D. R. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 10, p. 10581–10598, 2020.

DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 156–163, 2018.

DEMETRIO, P. M.; BONETTO, C.; RONCO, A. E. The effect of cypermethrin, chlorpyrifos, and glyphosate active ingredients and formulations on *Daphnia magna* (Straus). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 3, p. 268–273, 2014.

DENG, Z.; VAN LINDEN, N.; GUILLEN, E.; SPANJERS, H.; VAN LIER, J. B. Recovery and applications of ammoniacal nitrogen from nitrogen-loaded residual streams: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 295, p. 113096, 2021.

DENOYELLES, F.; KETTLE, W. D.; SINN, D. E. The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. **Ecology**, v. 63, n. 5, p. 1285–1293, 1982.

DOMENE, X.; MATTANA, S.; SÁNCHEZ-MORENO, S. Biochar addition rate determines contrasting shifts in soil nematode trophic groups in outdoor mesocosms: an appraisal of underlying mechanisms. **Applied Soil Ecology**, v. 158, p. 103788, 2021.

DOS SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P.; DOS ANJOS, L. H. C.; DE OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; DE ALMEIDA, J. A.; DE ARAUJO

- FILHO, J. C.; DE OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Brazilian soil classification system**. Brasília: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018. 345 p.
- DUARTE, M. A. **Ciclo de vida e dinâmica populacional de espécies nativas de Copepoda Cyclopoida em cultivos de laboratório**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2016.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. XXXII **Reunião de pesquisa de soja da região sul: indicações técnicas para a cultura de soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina – 2004/2005**. Em: 2004, Passo Fundo, RS. Passo Fundo, RS: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2004. v. 32, p. 170.
- ESPÍNDOLA, E. L. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; RIETZLER, A. C.; TUNDISI, J. G. Spatial heterogeneity of the Tucuruí Reservoir (State of Pará, Amazonia, Brazil) and the distribution of zooplanktonic species. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, p. 179–194, 2000.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 226 p.
- FANG, Y. Y.; BABOURINA, O.; RENGEL, Z.; YANG, X. E.; PU, P. M. Ammonium and nitrate uptake by the floating plant *Landoltia punctata*. **Annals of Botany**, v. 99, n. 2, p. 365–370, 2007.
- FINNEGAN, M. C.; EMBUREY, S.; HOMMEN, U.; BAXTER, L. R.; HOEKSTRA, P. F.; HANSON, M. L.; THOMPSON, H.; HAMER, M. A freshwater mesocosm study into the effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam at multiple trophic levels. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 1444–1457, 2018.
- FONSECA, A. L.; ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 16, n. 4, p. 319–32, 2004.

- FORGET, J.; PAVILLON, J.-F.; BELIAEFF, B.; BOCQUENÉ, G. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 912–918, 1999.
- GASTMANS, D.; CHANG, H. K.; HUTCHEON, I. Groundwater geochemical evolution in the northern portion of the Guarani Aquifer System (Brazil) and its relationship to diagenetic features. **Applied Geochemistry**, v. 25, n. 1, p. 16–33, 2010.
- GEORGE, J. P.; HINGORANI, H. G.; RAO, K. S. Herbicide toxicity to fish-food organisms. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, v. 28, n. 3, p. 183–188, 1982.
- GILBERT, J. J. Competition between rotifers and *Daphnia*. **Ecology**, v. 66, n. 6, p. 1943–1950, 1985.
- GILBERT, J. J. Susceptibilities of ten rotifer species to interference from *Daphnia pulex*. **Ecology**, v. 69, n. 6, p. 1826–1838, 1988.
- GOLOMBIESKI, J. I.; MARCHESAN, E.; BAUMART, J. S.; REIMCHE, G. B.; RESGALLA JÚNIOR, C.; STORCK, L.; SANTOS, S. Cladocers, copepods and rotifers in rice-fish culture handled with metsulfuron-methyl and azimsulfuron herbicides and carbofuran insecticide. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2097–2102, 2008.
- HAMILTON, D. P.; MITCHELL, S. F. An empirical model for sediment resuspension in shallow lakes. **Hydrobiologia**, v. 317, n. 3, p. 209–220, 1996.
- HANAZATO, T. Response of a zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of freshwater communities. **Environmental Pollution**, v. 101, n. 3, p. 361–373, 1998.
- HANAZATO, T. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. **Environmental Pollution**, v. 112, n. 1, p. 1–10, 2001.



- HAYASAKA, D.; KORENAGA, T.; SUZUKI, K.; SAITO, F.; SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 355–362, 2012a.
- HAYASAKA, D.; KORENAGA, T.; SUZUKI, K.; SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Differences in Susceptibility of Five Cladoceran species to two systemic insecticides, imidacloprid and fipronil. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 2, p. 421–427, 2012b.
- HÉBERT, M.-P.; FUGÈRE, V.; BEISNER, B. E.; BARBOSA DA COSTA, N.; BARRETT, R. D. H.; BELL, G.; SHAPIRO, B. J.; YARGEAU, V.; GONZALEZ, A.; FUSSMANN, G. F. Widespread agrochemicals differentially affect zooplankton biomass and community structure. **Ecological Applications**, v. 31, n. 7, p. e02423, 2021.
- HEINLE, D. R.; HARRIS, R. P.; USTACH, J. F.; FLEMER, D. A. Detritus as food for estuarine copepods. **Marine Biology**, v. 40, n. 4, p. 341–353, 1977.
- HERNÁNDEZ, A. F.; GIL, F.; LACASAÑA, M. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 10, p. 3211–3223, 2017.
- HEUSCHELE, J.; LODE, T.; KONESTABO, H. S.; TITELMAN, J.; ANDERSEN, T.; BORGÅ, K. Drivers of copper sensitivity in copepods: a meta-analysis of LC50s. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, p. 113907, 2022.
- HOUSSOU, A. M.; COCAN, D.; BONOU, C. A.; MIRESAN, V.; MONTCHOWUI, E. Survival and reproduction of *Cyclops abyssorum* (freshwater copepod) exposed to spirotetramat and 2,4-D. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, n. 4, p. 13761–13770, 2018.
- IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Perfil ambiental 2,4-D (ácido): CAS 94-75-7**, 2019a. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis->

ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20-%2024-D%20cido%20-%2002\_10\_2019.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2022.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Perfil ambiental Fipronil: CAS 120068-37-3**, 2019b. Disponível em: <[https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20-%20Fipronil%20-%2002\\_10\\_2019.pdf](https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20-%20Fipronil%20-%2002_10_2019.pdf)>. Acesso em: 27 dez. 2022.

ISENSEE, A. R. Variability of aquatic model ecosystem-derived data. **International Journal of Environmental Studies**, v. 10, n. 1, p. 35–41, 1976.

JACKSON, M. C.; LOEWEN, C. J. G.; VINEBROOKE, R. D.; CHIMIMBA, C. T. Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. **Global Change Biology**, v. 22, n. 1, p. 180–189, 2016.

JACQUES, M. T.; BORNHORST, J.; SOARES, M. V.; SCHWERDTLE, T.; GARCIA, S.; ÁVILA, D. S. Reprotoxicity of glyphosate-based formulation in caenorhabditis elegans is not due to the active ingredient only. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1854–1862, 2019.

JÓNASSON, P. M.; ADALSTEINSSON, H. Phytoplankton production in shallow eutrophic Lake Mývatn, Iceland. **Oikos**, v. 32, n. 1/2, p. 113–138, 1979.

JONKER, M. J.; SVENDSEN, C.; BEDAUX, J. J. M.; BONGERS, M.; KAMMENGA, J. E. 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.

JURADO, E.; ZALDÍVAR, J.-M.; MARINOV, D.; DACHS, J. Fate of persistent organic pollutants in the water column: does turbulent mixing matter? **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 441–451, 2007.

KALAJI, H. M.; OUKARROUM, A.; ALEXANDROV, V.; KOUZMANOVA, M.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I. A.; CETNER, M. D.;

- ALLAKHVERDIEV, S. I.; GOLTSEV, V. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. **Plant Physiology and Biochemistry**, Photosynthesis Research for Sustainability. v. 81, p. 16–25, 2014.
- KEERTHI, A. T.; THANGA, V. S. G. Growth response study of fipronil degrading bacteria and abundance of microorganisms from cardamom plantation soils, Idukki district, Kerala. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 6, n. 8, p. 484–489, 2016.
- KHATRI, N.; TYAGI, S. Influences of natural and anthropogenic factors on surface and groundwater quality in rural and urban areas. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 1, p. 23–39, 2015.
- KNAUER, K.; MAISE, S.; THOMA, G.; HOMMEN, U.; GONZALEZ-VALERO, J. Long-term variability of zooplankton populations in aquatic mesocosms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 1182–1189, 2005.
- KONWICK, B. J.; FISK, A. T.; GARRISON, A. W.; AVANTS, J. K.; BLACK, M. C. Acute Enantioselective toxicity of fipronil and its desulfinyl photoproduct to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 2350–2355, 2005.
- KOSKI-VÄHÄLÄ, J.; HARTIKAINEN, H.; TALLBERG, P. Phosphorus mobilization from various sediment pools in response to increased pH and silicate concentration. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, n. 2, p. 546–552, 2001.
- KRAUFVELIN, P. Model ecosystem replicability challenged by the “soft” reality of a hard bottom mesocosm. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 222, n. 1, p. 247–267, 1998.
- KRUSCHE, A. V.; DE CAMARGO, P. B.; CERRI, C. E.; BALLESTER, M. V.; LARA, L. B. L. S.; VICTORIA, R. L.; MARTINELLI, L. A. Acid rain and nitrogen deposition in a sub-tropical watershed (Piracicaba): ecosystem consequences. **Environmental Pollution**, v. 121, n. 3, p. 389–399, 2003.

- KULKARNI, D.; GERGS, A.; HOMMEN, U.; RATTE, H. T.; PREUSS, T. G. A plea for the use of copepods in freshwater ecotoxicology. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 1, p. 75–85, 2013.
- LANSAC-TÔHA, F. A.; BINI, L. M.; VELHO, L. F. M.; BONECKER, C. C.; TAKAHASHI, E. M.; VIEIRA, L. C. G. Temporal coherence of zooplankton abundance in a tropical reservoir. **Hydrobiologia**, v. 614, n. 1, p. 387–399, 2008.
- LARA, L. B. L. S.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L. A.; VICTORIA, R. L.; CAMARGO, P. B.; KRUSCHE, A.; AYERS, G. P.; FERRAZ, E. S. B.; BALLESTER, M. V. Chemical composition of rainwater and anthropogenic influences in the Piracicaba river basin, southeast Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 35, n. 29, p. 4937–4945, 2001.
- LEE, Y.; OLESZKIEWICZ, J. A. Effects of predation and ORP conditions on the performance of nitrifiers in activated sludge systems. **Water Research**, v. 37, n. 17, p. 4202–4210, 2003.
- LEFCHECK, J. S.; DUFFY, J. E. Multitrophic functional diversity predicts ecosystem functioning in experimental assemblages of estuarine consumers. **Ecology**, v. 96, n. 11, p. 2973–2983, 2015.
- LEGRAND, E.; BOULANGÉ-LECOMTE, C.; RESTOUX, G.; TRÉMOLET, G.; DUFLOT, A.; FORGET-LERAY, J. Individual and mixture acute toxicity of model pesticides chlordecone and pyriproxyfen in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 6, p. 5976–5984, 2017.
- LEITE, C. M. de C.; WENDLAND, E.; GASTMANS, D. Caracterização hidrogeoquímica de águas subterrâneas utilizadas para abastecimento público na porção nordeste do Sistema Aquífero Guarani. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 26, p. 29–43, 2021.
- LICHTENSTEIN, E. P.; LIANG, T. T.; ANDEREGG, B. N. Synergism of insecticides by herbicides. **Science**, v. 181, n. 4102, p. 847–849, 1973.

- LIJKLEMA, L. Nutrient dynamics in shallow lakes: effects of changes in loading and role of sediment-water interactions. **Hydrobiologia**, v. 275, n. 1, p. 335–348, 1994.
- LOPES, I.; MOREIRA-SANTOS, M.; DA SILVA, E. M.; SOUSA, J. P.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. In situ assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. **Chemosphere**, v. 67, n. 11, p. 2250–2256, 2007.
- LOPES, L. F. de P.; AGOSTINI, V. O.; MOREIRA, R. A.; MUXAGATA, E. *Acartia tonsa* Dana 1849 as a model organism: considerations on acclimation in ecotoxicological assays. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 106, n. 5, p. 734–739, 2021.
- LOZANO, S. J.; O'HALLORAN, S. L.; SARGENT, K. W.; BRAZNER, J. C. Effects of esfenvalerate on aquatic organisms in littoral enclosures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 35–47, 1992.
- LOZANO, V. L.; ALLEN DOHLE, S.; VERA, M. S.; TORREMORELL, A.; PIZARRO, H. N. Primary production of freshwater microbial communities is affected by a cocktail of herbicides in an outdoor experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, p. 110821, 2020.
- LUGO, A.; BRAVO-INCLÁN, L. A.; ALCOCER, J.; GAYTÁN, M. L.; OLIVA, Ma. G.; SÁNCHEZ, Ma. del R.; CHÁVEZ, M.; VILACLARA, G. Effect on the planktonic community of the chemical program used to control water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Guadalupe Dam, Mexico. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 1, n. 3, p. 333–343, 1998.
- MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. Calanoida (Copepoda) species composition changes in the reservoirs of São Paulo State (Brazil) in the last twenty years. **Hydrobiologia**, v. 504, n. 1, p. 215–222, 2003.
- MEDINA, M.; BARATA, C.; TELFER, T.; BAIRD, D. J. Age- and sex-related variation in sensitivity to the pyrethroid cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa*

Dana. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 17–22, 2002.

MEDINA, M.; BARATA, C.; TELFER, T.; BAIRD, D. J. Assessing the risks to zooplankton grazers of continuous versus pulsed cypermethrin exposures from marine cage aquaculture. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 67–73, 2004.

MESNAGE, R.; ANTONIOU, M. N. Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. **Frontiers in Public Health**, v. 5, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2017.00361>>. Acesso em: 3 ago. 2022.

MILAM, C. D.; FARRIS, J. L.; DWYER, F. J.; HARDESTY, D. K. Acute toxicity of six freshwater mussel species (Glochidia) to six chemicals: implications for daphnids and utterbackia imbecillis as surrogates for protection of freshwater mussels (Unionidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 166–173, 2005.

MOHAMMED, A. **Why are early life stages of aquatic organisms more sensitive to toxicants than adults?** Saudi Arabia: IntechOpen, 2013.

MOI, D. A.; ALVES, D. C.; ANTIQUEIRA, P. A. P.; THOMAZ, S. M.; TEIXEIRA DE MELLO, F.; BONECKER, C. C.; RODRIGUES, L. C.; GARCÍA-RÍOS, R.; MORMUL, R. P. Ecosystem shift from submerged to floating plants simplifying the food web in a tropical shallow lake. **Ecosystems**, v. 24, n. 3, p. 628–639, 2021.

MOREIRA, R. A.; ARAÚJO, C. V. M.; JUNIO DA SILVA PINTO, T.; MENEZES DA SILVA, L. C.; GOULART, B. V.; VIANA, N. P.; MONTAGNER, C. C.; FERNANDES, M. N.; GAETA ESPINDOLA, E. L. Fipronil and 2,4-D effects on tropical fish: could avoidance response be explained by changes in swimming behavior and neurotransmission impairments? **Chemosphere**, v. 263, p. 127972, 2021.

- MOREIRA, R. A.; MANSANO, A. S.; ROCHA, O. Life cycle traits of *Philodina roseola* Ehrenberg, 1830 (Rotifera, Bdelloidea), a model organism for bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 579–588, 2016.
- MORTIMER, C. H. The exchange of dissolved substances between mud and water in lakes. **Journal of Ecology**, v. 30, n. 1, p. 147–201, 1942.
- MUTURI, E. J.; DONTU, R. K.; FIELDS, C. J.; MOISE, I. K.; KIM, C.-H. Effect of pesticides on microbial communities in container aquatic habitats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44565, 2017.
- NAGY, K.; DUCA, R. C.; LOVAS, S.; CRETA, M.; SCHEEPERS, P. T. J.; GODDERIS, L.; ÁDÁM, B. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. **Environmental Research**, v. 181, p. 108926, 2020.
- NEJSTGAARD, J. C.; GISMERVIK, I.; SOLBERG, P. T. Feeding and reproduction by *Calanus finmarchicus*, and microzooplankton grazing during mesocosm blooms of diatoms and the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 147, n. 1/3, p. 197–217, 1997.
- NEVES, I. F.; ROCHA, O.; ROCHE, K. F.; PINTO, A. A. Zooplankton community structure of two marginal lakes of the river Cuiabá (Mato Grosso, Brazil) with analysis of Rotifera and Cladocera diversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 329–343, 2003.
- NOVELLI, A. **Efeito do Vertimec® 18CE e de seu princípio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e in situ**. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2010.
- OLIVEIRA, A. R.; BRAGA, M. B. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 87 - Florescimento e acamamento de cultivares de cana-de-açúcar submetidas a diferentes lâminas de irrigação**. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2011. Disponível em:

<[www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/916939/1/BPD87.pdf](http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/916939/1/BPD87.pdf)>. Acesso em: 30 dez. 2022.

OMAIR, M.; NAYLOR, B.; JUDE, D. J.; QUDDUS, J.; BEALS, T. F.; VANDERPLOEG, H. A. Histology of herniations through the body wall and cuticle of zooplankton from the Laurentian Great Lakes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 2, p. 108–113, 2001.

OMAIR, M.; VANDERPLOEG, H. A.; JUDE, D. J.; FAHNENSTIEL, G. L. First observations of tumor-like abnormalities (exophytic lesions) on Lake Michigan zooplankton. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 56, n. 10, p. 1711–1715, 1999.

ORIS, J. T.; WINNER, R. W.; MOORE, M. V. A Four-day survival and reproduction toxicity test for *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 217–224, 1991.

PENEZIĆ, A.; GAŠPAROVIĆ, B.; CUCULIĆ, V.; STRMEČKI, S.; DJAKOVAC, T.; MLAKAR, M. Dissolved trace metals and organic matter distribution in the Northern Adriatic, an increasingly oligotrophic shallow sea. **Water**, v. 14, n. 3, p. 349, 2022.

PEREIRA, A. S.; CEREJEIRA, M. J.; DAAM, M. A. Toxicity of environmentally realistic concentrations of chlorpyrifos and terbuthylazine in indoor microcosms. **Chemosphere**, v. 182, p. 348–355, 2017.

PEREIRA, A. S.; DÂMASO-RODRIGUES, M. L.; AMORIM, A.; DAAM, M. A.; CEREJEIRA, M. J. Aquatic community structure in mediterranean edge-of-field waterbodies as explained by environmental factors and the presence of pesticide mixtures. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 6, p. 661–674, 2018.

PEREIRA, J. L.; ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B.; MARQUES, C. R.; GONÇALVES, A. M. M.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 4, p. 455–463, 2009.



- PERSCHBACHER, P. W.; LUDWIG, G. M. Effects of diuron and other aerially applied cotton herbicides and defoliantes on the plankton communities of aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 233, n. 1, p. 197–203, 2004.
- PERSCHBACHER, P. W.; LUDWIG, G. M.; SLATON, N. Effects of common aerially applied rice herbicides on the plankton communities of aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 214, n. 1, p. 241–246, 2002.
- PINTO, T. J. da S.; MOREIRA, R. A.; FREITAS, J. S. schmidt; DA SILVA, L. C. M.; YOSHII, M. P. C.; DE PALMA LOPES, L. F.; OGURA, A. P.; DE MELLO GABRIEL, G. V.; ROSA, L. M. T.; SCHIESARI, L.; DO CARMO, J. B.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. Responses of *Chironomus sancticaroli* to the simulation of environmental contamination by sugarcane management practices: water and sediment toxicity. **Science of The Total Environment**, v. 857, p. 159643, 2023.
- PINTO, T. J. da S.; MOREIRA, R. A.; SILVA, L. C. M. da; YOSHII, M. P. C.; GOULART, B. V.; FRAGA, P. D.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. Impact of 2,4-D and fipronil on the tropical midge *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, p. 111778, 2021.
- PITOMBEIRA, F. L.; ATHAYDE, D. B.; DAAM, M. A.; VAN GESTEL, C. A. M.; GUERRA, G. da S.; DUARTE-NETO, P. J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. 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, 2020.
- QIN, G.; PRESLEY, S. M.; ANDERSON, T. A.; GAO, W.; MAUL, J. D. Effects of predator cues on pesticide toxicity: toward an understanding of the mechanism of the interaction. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1926–1934, 2011.
- RABELO, J. L.; WENDLAND, E. Estudo da interação rio-aquífero no sistema Jacaré-Tietê por meio de um modelo numérico baseado em SIG (2010). **Águas**

**Subterrâneas**, 6 set. 2010. Disponível em: <<https://aguassubterraneas.abas.org/asubterraneas/article/view/23162>>. Acesso em: 5 dez. 2022.

RABINOWITCH, E. I.; GOVINDJEE. The role of chlorophyll in photosynthesis. **Scientific American**, v. 213, n. 1, p. 74–83, 1965.

RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications**, v. 15, n. 2, p. 618–627, 2005.

RESENDE, J. C. **Efeitos diretos e indiretos do agrotóxico Vertimec® 18 de girinos de *Lithobates catesbeianus* nos ecossistemas de água doce: um estudo em mesocosmos**. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2015.

RICHARDSON, J.; FEUCHTMAYR, H.; MILLER, C.; HUNTER, P. D.; MABERLY, S. C.; CARVALHO, L. Response of cyanobacteria and phytoplankton abundance to warming, extreme rainfall events and nutrient enrichment. **Global Change Biology**, v. 25, n. 10, p. 3365–3380, 2019.

RICO-MARTÍNEZ, R.; ARIAS-ALMEIDA, J. C.; PÉREZ-LEGASPI, I. A.; ALVARADO-FLORES, J.; RETES-PRUNEDA, J. L.; RICO-MARTÍNEZ, R.; ARIAS-ALMEIDA, J. C.; PÉREZ-LEGASPI, I. A.; ALVARADO-FLORES, J.; RETES-PRUNEDA, J. L. **Adverse Effects of Herbicides on Freshwater Zooplankton**. Londres, Inglaterra: IntechOpen, 2012. 504 p.

RIETZLER, A. C.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. Life cycle, feeding and adaptive strategy implications on the co-occurrence of *Argyrodiaptomus furcatus* and *Notodiaptomus iheringi* in Lobo-Broa Reservoir (SP, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 93–105, 2002.

RIGLER, F. H. A tracer study of the phosphorus cycle in Lake Water. **Ecology**, v. 37, n. 3, p. 550–562, 1956.

- ROBERTSON, E. B.; BUNTING, D. L. The acute toxicity of four herbicides to 0–4 hour nauplii of *Cyclops vernalis* Fisher (Copepoda, Cyclopoida). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 16, n. 6, p. 682–688, 1976.
- ROBINSON, S. a.; RICHARDSON, S. d.; DALTON, R. l.; MAISONNEUVE, F.; BARTLETT, A. j.; DE SOLLA, S. r.; TRUDEAU, V. l.; WALTHO, N. Assessment of sublethal effects of neonicotinoid insecticides on the life-history traits of 2 frog species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 9, p. 1967–1977, 2019.
- RODRÍGUEZ-GALLEGO, L. R.; MAZZEO, N.; GORGA, J.; MEERHOFF, M.; CLEMENTE, J.; KRUK, C.; SCASSO, F.; LACEROT, G.; GARCÍA, J.; QUINTANS, F. The effects of an artificial wetland dominated by free-floating plants on the restoration of a subtropical, hypertrophic lake. **Lakes & Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use**, v. 9, n. 3–4, p. 203–215, 2004.
- ROMBAUT, G.; GROMMEN, R.; ZIZHONG, Q.; VANHOOF, V.; SUANTIKA, G.; DHERT, P.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Improved performance of an intensive rotifer culture system by using a nitrifying inoculum (ABIL). **Aquaculture Research**, v. 34, n. 2, p. 165–174, 2003.
- SAALIDONG, B. M.; ARAM, S. A.; OTU, S.; LARTEY, P. O. Examining the dynamics of the relationship between water pH and other water quality parameters in ground and surface water systems. **PLOS ONE**, v. 17, n. 1, p. e0262117, 2022.
- SABUR, M. A.; PARSONS, C. T.; MAAVARA, T.; VAN CAPPELLEN, P. Effects of pH and dissolved silicate on phosphate mineral-water partitioning with goethite. **ACS Earth and Space Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 34–43, 2022.
- SAGRARIO, G.; DE LOSÁNGELES, M.; BALSEIRO, E.; ITUARTE, R.; SPIVAK, E. Macrophytes as refuge or risky area for zooplankton: a balance set by littoral predacious macroinvertebrates. **Freshwater Biology**, v. 54, n. 5, p. 1042–1053, 2009.

- SANCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R. V. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 577–586, 2011.
- SANDERSON, H. Pesticide studies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 9, n. 6, p. 429–435, 2002.
- SANDERSON, H.; LAIRD, B.; BRAIN, R.; WILSON, C. J.; SOLOMON, K. R. Detectability of fifteen aquatic micro/mesocosms. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 7, p. 838–845, 2009.
- SANTOS, B. F. dos; TREVISAN, D. P.; MOSCHINI, L. E. Caracterização ambiental da paisagem do município de Itirapina/SP. **Revista Hipótese**, v. 4, n. 2, p. 56–76, 2018.
- SARMA, S. S. S.; RAMÍEZ-PÉREZ, T.; NANDINI, S.; PEÑALOSA-CASTRO, I. Combined effects of food concentration and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the population dynamics of *Brachionus patulus* (Rotifera). **Ecotoxicology**, v. 10, n. 2, p. 91–99, 2001.
- SCHALLENBERG, M.; BURNS, C. W. Effects of sediment resuspension on phytoplankton production: teasing apart the influences of light, nutrients and algal entrainment. **Freshwater Biology**, v. 49, n. 2, p. 143–159, 2004.
- SCHEFFER, M. Multiplicity of stable states in freshwater systems. (R. D. Gulati, E. H. R. R. Lammens, M.-L. Meijer, E. van Donk) Em: **Bio-manipulation Tool for Water Management**, 1990, Dordrecht. Dordrecht: Springer Netherlands, 1990. p. 475–486.
- SCHEFFER, M. **Ecology of shallow lakes**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004. 346 p.
- SCHEFFER, M.; VAN NES, E. H. Shallow lakes theory revisited: various alternative regimes driven by climate, nutrients, depth and lake size. **Hydrobiologia**, v. 584, n. 1, p. 455–466, 2007.

- SCHMITT-JANSEN, M.; VEIT, U.; DUDEL, G.; ALTENBURGER, R. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: approaches and challenges. **Basic and Applied Ecology**, v. 9, n. 4, p. 337–345, 2008.
- SILVA, L. C. M.; MOREIRA, R. A.; PINTO, T. J. S.; OGURA, A. P.; YOSHII, M. P. C.; LOPES, L. F. P.; MONTAGNER, C. C.; GOULART, B. V.; DAAM, M. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology**, 2020.
- SNELL, T. W.; MOFFAT, B. D. A 2-d Life Cycle Test with the rotifer *Brachionus calyciflorus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1249–1257, 1992.
- 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.
- SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. Brasília, Brasil: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2004. 416 p.
- 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, 2005.
- STARKWEATHER, P. L.; GILBERT, J. J.; FROST, T. M. Bacterial feeding by the rotifer *Brachionus calyciflorus*: clearance and ingestion rates, behavior and population dynamics. **Oecologia**, v. 44, n. 1, p. 26–30, 1979.
- STEVENS, M. M.; BURDETT, A. S.; MUDFORD, E. M.; HELLIWELL, S.; DORAN, G. The acute toxicity of fipronil to two non-target invertebrates associated with mosquito breeding sites in Australia. **Acta Tropica**, v. 117, n. 2, p. 125–130, 2011.
- THEY, N. H.; MARQUES, D. da M. The structuring role of macrophytes on plankton community composition and bacterial metabolism in a large subtropical shallow lake. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 31, n. 19, 2019. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/j/alb/a/HhjkyJ8qGNWnrRhm9gSZ4VP/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 1 dez. 2022.

THORNTON, K. W.; KIMMEL, B. L.; PAYNE, F. E. **Reservoir limnology: ecological perspectives**. John Wiley & Sons, 1991. 262 p.

TOMINACK, R. L.; TOMINACK, R. Herbicide formulations. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 129–135, 2000.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. The ecology of UHE Carlos Botelho (Lobo-Broa Reservoir) and its watershed, São Paulo, Brazil. **Freshwater Reviews**, v. 6, n. 2, p. 75–91, 2014.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Limnology**. Boca Ratón: CRC Press, 2017. 888 p.

US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **New pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005**. Washington: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances: U.S. Environmental Protection Agency, 1996. 10 p.

US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Turbidity**, 2012. Disponível em: <<https://archive.epa.gov/water/archive/web/html/vms55.html#:~:text=Turbidity%20is%20a%20measure%20of,%2C%20microbes%2C%20and%20other%20substances.>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **US-EPA database**, 2018. Disponível em: <<https://cfpub.epa.gov/ecotox/>>. Acesso em: 6 dez. 2018.

US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Dissolved oxygen**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/caddis-vol2/dissolved-oxygen>>. Acesso em: 1 mar. 2023a.

- US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Inert ingredients overview and guidance**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/opprd001/inerts/>>. Acesso em: 18 dez. 2022b.
- VAN GEEST, J. L.; BURRIDGE, L. E.; FIFE, F. J.; KIDD, K. A. feeding response in marine copepods as a measure of acute toxicity of four anti-sea lice pesticides. **Marine Environmental Research**, v. 101, p. 145–152, 2014.
- VIANA, N. P.; DA SILVA, L. C. M.; PORTRUNELI, N.; SOARES, M. P.; CARDOSO, I. L.; BONANSEA, R. I.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; WUNDERLIN, D. A.; FERNANDES, M. N. Bioconcentration and toxicological impacts of fipronil and 2,4-D commercial formulations (single and in mixture) in the tropical fish, *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 8, p. 11685–11698, 2022.
- VOGT, R. A.; IGNOFFO, T. R.; SULLIVAN, L. J.; HERNDON, J.; STILLMAN, J. H.; KIMMERER, W. J. Feeding capabilities and limitations in the nauplii of two pelagic estuarine copepods, *Pseudodiaptomus marinus* and *Oithona davisae*. **Limnology and Oceanography**, v. 58, n. 6, p. 2145–2157, 2013.
- WANG, Z.; MEADOR, J. P.; LEUNG, K. M. Y. Metal toxicity to freshwater organisms as a function of pH: a meta-analysis. **Chemosphere**, v. 144, p. 1544–1552, 2016.
- WARWICK, R. M.; CLARKE, K. R. Increased variability as a symptom of stress in marine communities. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Changes in Marine Communities. v. 172, n. 1, p. 215–226, 1993.
- WETZEL, R. G. **Limnology: Lake and River Ecosystems**. San Diego: Academic Press, 2001. 1014 p.
- WILLIS, K. J.; LING, N. The toxicity of emamectin benzoate, an aquaculture pesticide, to planktonic marine copepods. **Aquaculture**, v. 221, n. 1, p. 289–297, 2003.

YOSHII, M. P. C. **Efeitos do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil, isolados e em mistura, em macrófitas aquáticas e fauna associada.** Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2022.

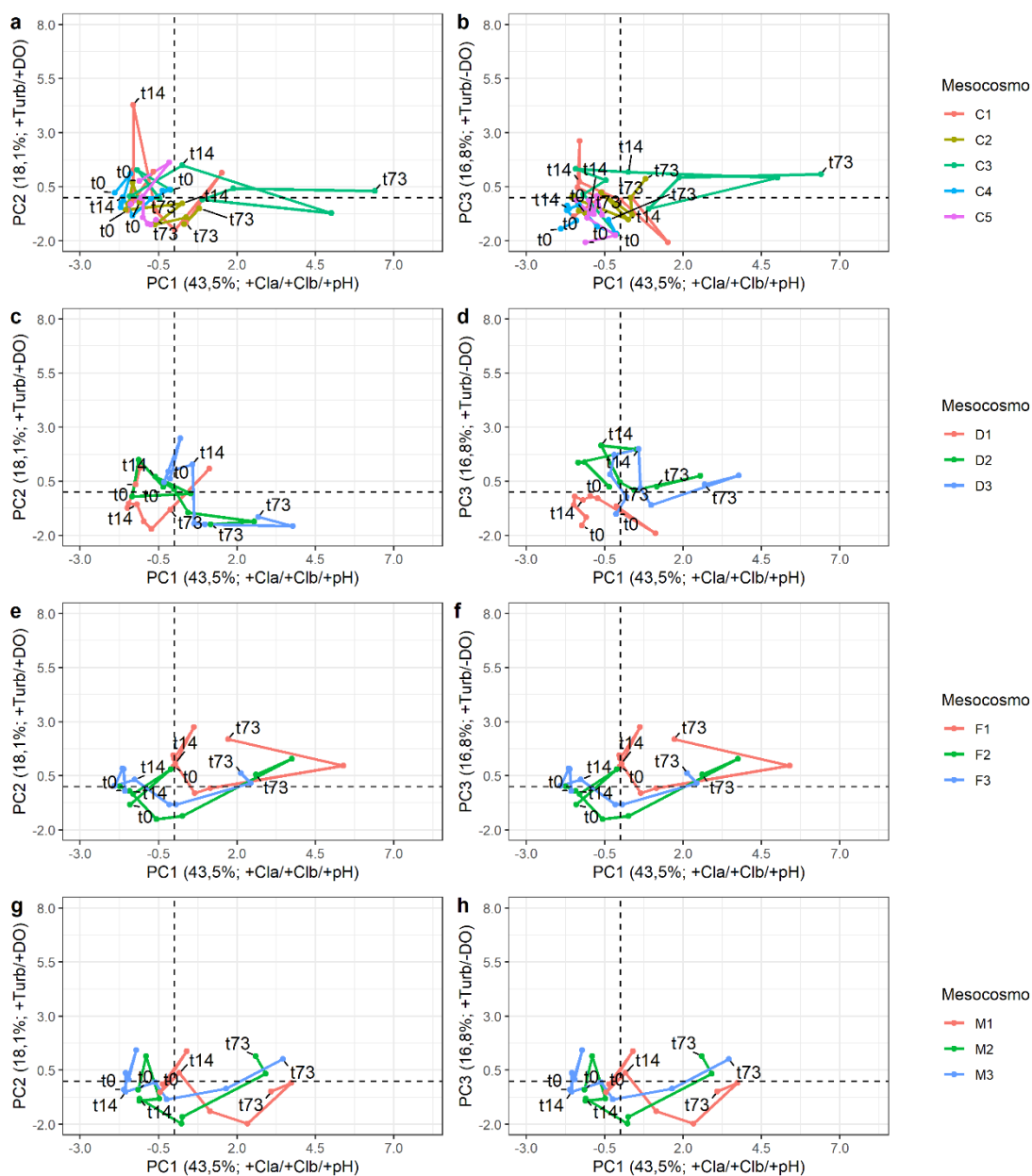
ZINGEL, P.; NOGES, P.; TUVIKENE, L.; FELDMANN, T.; JARVALT, A.; TONNO, I.; AGASILD, H.; TAMMERT, H.; LUUP, H.; SALUJOE, J.; NOGES, T. Ecological processes in macrophyte- and phytoplankton-dominated shallow lakes. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences Biology Ecology**, v. 55, n. 4, p. 280–307, 2006.



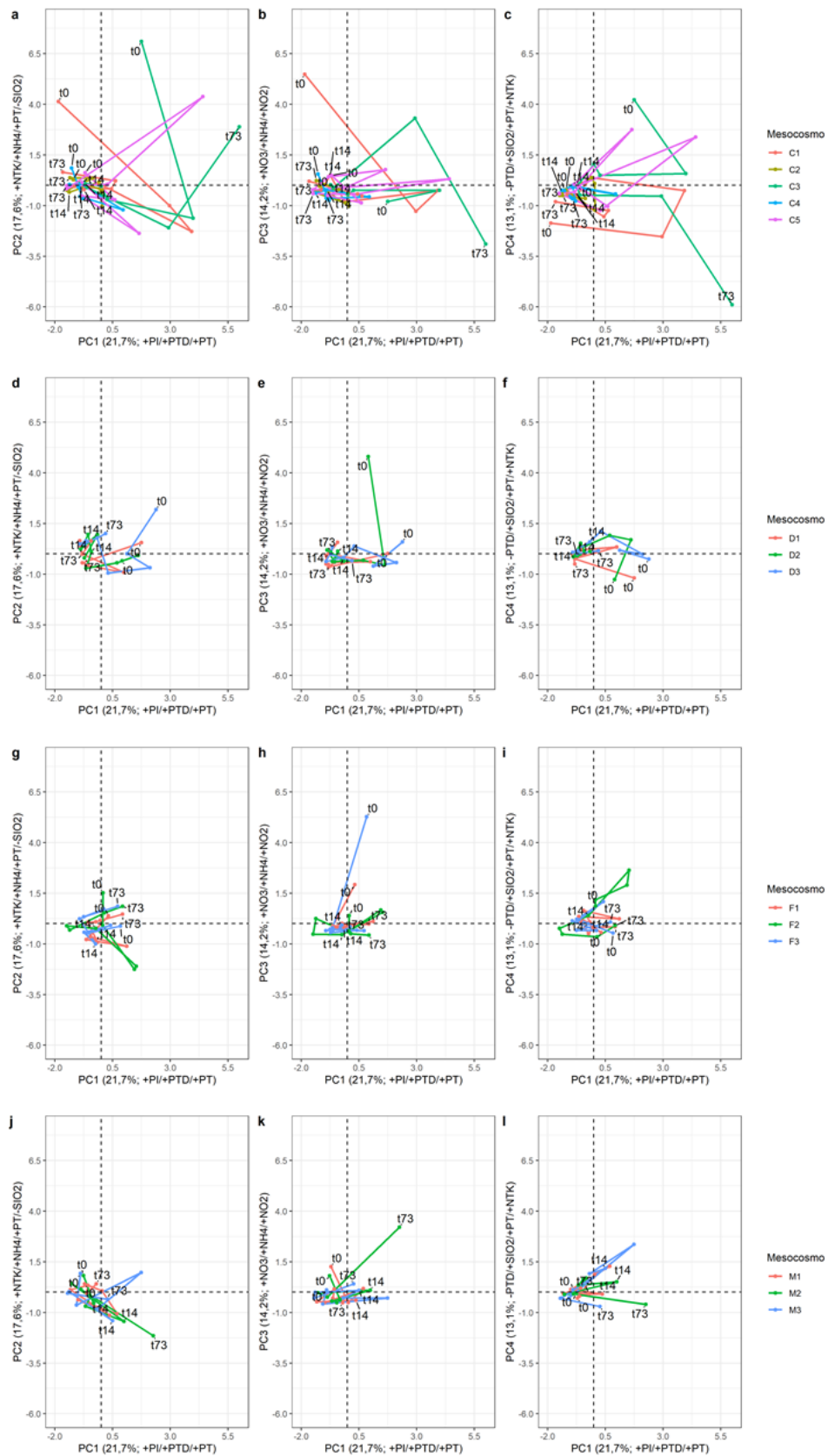
**APÊNDICE A**  
**MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 1**

**Apêndice A1.** Comprimento de onda (CM) da análise de metais, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

Metais	CM (nm)	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )
Alumínio	396,15	$8,20 \times 10^{-7}$	$2,50 \times 10^{-6}$
Bário	455,403	$1,20 \times 10^{-8}$	$3,50 \times 10^{-8}$
Cádmio	228,80	$8,40 \times 10^{-7}$	$2,50 \times 10^{-6}$
Chumbo	405,78	$1,50 \times 10^{-5}$	$4,50 \times 10^{-5}$
Cobalto	340,512	$3,2 \times 10^{-9}$	$9,6 \times 10^{-9}$
Cromo	425,43	$1,50 \times 10^{-7}$	$4,60 \times 10^{-7}$
Cobre	324,75	$6,40 \times 10^{-8}$	$2,00 \times 10^{-7}$
Estrôncio	407,77	$2,20 \times 10^{-8}$	$6,60 \times 10^{-8}$
Manganês	403,08	$8,10 \times 10^{-7}$	$2,50 \times 10^{-6}$
Molibdênio	379,825	$1,7 \times 10^{-10}$	$5,1 \times 10^{-10}$
Níquel	352,45	$4,50 \times 10^{-7}$	$1,40 \times 10^{-6}$
Potássio	766,49	$7,40 \times 10^{-7}$	$22,20 \times 10^{-7}$
Zinco	213,86	$7,40 \times 10^{-7}$	$2,30 \times 10^{-6}$

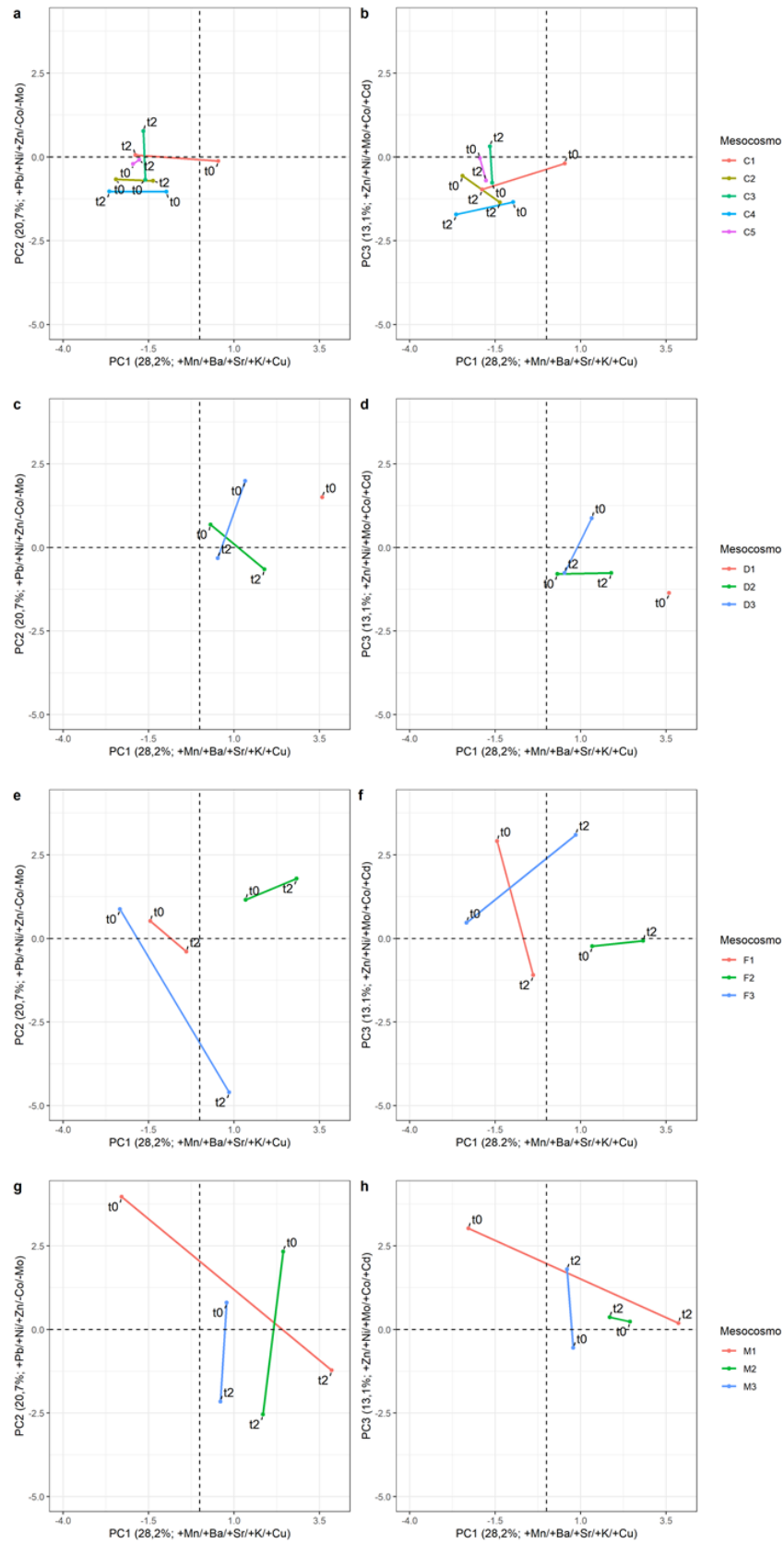


**Apêndice A2.** Componentes principais/*principal component* (PC) das variáveis físico e químicas em cada tratamento representada por cada mesocosmo. Tratamento Controle e suas cinco réplicas como mesocosmos C1, C2, C3, C4 e C5: **a)** PC1 versus PC2; e **b)** PC1 versus PC3. Tratamento 2,4-D e suas três réplicas como mesocosmos D1, D2 e D3: **c)** PC1 versus PC2; e **d)** PC1 versus PC3. Tratamento Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos F1, F2 e F3: **e)** PC1 versus PC2; e **f)** PC1 versus PC3. Tratamento da mistura de 2,4-D e Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos M1, M2 e M3: **g)** PC1 versus PC2; e **h)** PC1 versus PC3. As variáveis Clb= clorofila b, Cla= clorofila a e pH= potencial de hidrogênio contribuíram para a PC1. As variáveis OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez contribuíram para a PC2. As variáveis OD= oxigênio dissolvido e Turb= turbidez contribuíram para a PC3. “t0”, “t14” e “t73” são os dias 0, 14, e 73 da coleta referente ao dia da contaminação (0 dias). “+” significa que a PC está relacionada positivamente a variável. “-” significa que a PC está relacionada negativamente a variável.



**Apêndice A3** Componentes principais/*principal component* (PC) dos nutrientes em cada tratamento representada por cada mesocosmo. Tratamento Controle e suas cinco réplicas como mesocosmos C1, C2,

C3, C4 e C5: **a)** PC1 versus PC2; **b)** PC1 versus PC3; e **c)** PC1 versus PC4. Tratamento 2,4-D e suas três réplicas como mesocosmos: D1, D2 e D3: **d)** PC1 versus PC2; **e)** PC1 versus PC3; e **f)** PC1 versus PC4. Tratamento Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos F1, F2 e F3: **g)** PC1 versus PC2; **h)** PC1 versus PC3; e **i)** PC1 versus PC4. Tratamento da mistura de 2,4-D e Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos M1, M2 e M3: **j)** PC1 versus PC2; **k)** PC1 versus PC3; e **l)** PC1 versus PC4. As variáveis PI= fosfato inorgânico, PTD= fosfato total dissolvido e PT= fósforo total contribuíram para a PC1. As variáveis NTK= nitrogênio total de Kjeldahl, NH<sub>4</sub>= íon amônio, PT e SiO<sub>2</sub>= silicato reativo contribuíram para a PC2. As variáveis NO<sub>2</sub>= nitrito, NO<sub>3</sub>= nitrato e NH<sub>4</sub> contribuíram para PC3. As variáveis PTD, SiO<sub>2</sub>, PT e NTK contribuíram para PC4. “t0”, “t14” e “t73” são os dias 0, 14 e 73 da coleta referente ao dia da contaminação (0 dias). “+” significa que a PC está relacionada positivamente a variável. “-” significa que a PC está relacionada negativamente a variável.

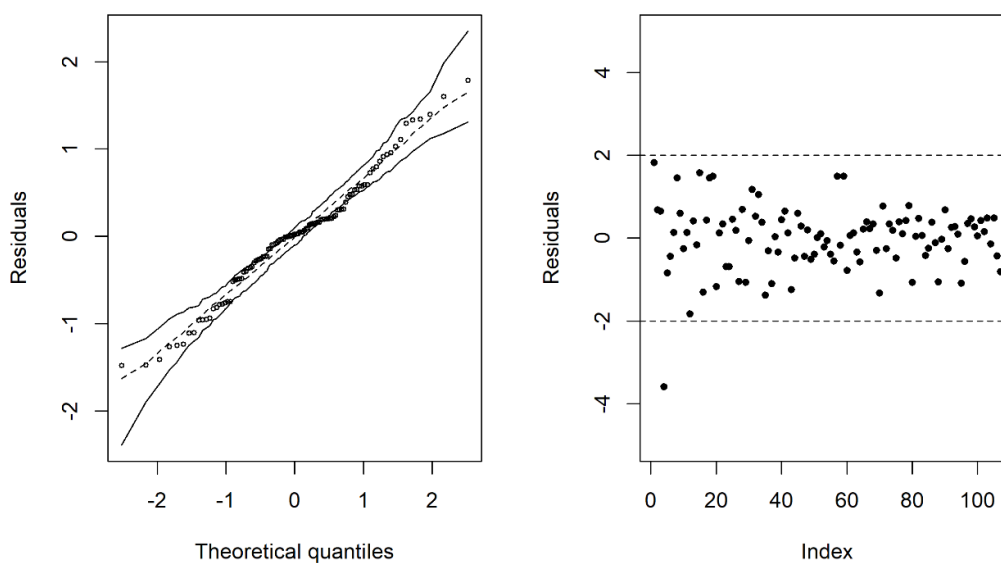


**Apêndice A4.** Componentes principais/principal component (PC) dos metais em cada tratamento representada por cada mesocosmo. Tratamento Controle e suas cinco réplicas como mesocosmos C1, C2,

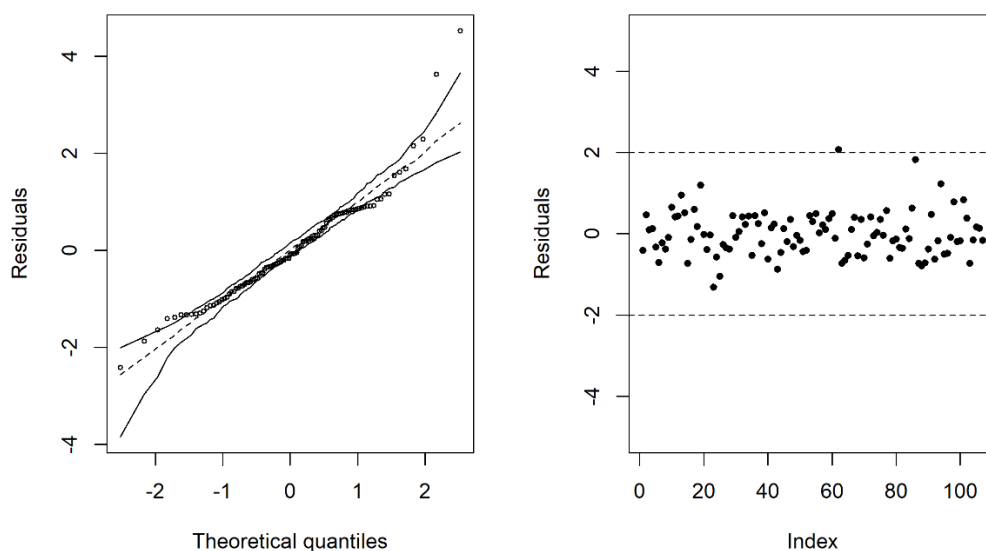
C3, C4 e C5: **a)** PC1 versus PC2 e **b)** PC1 versus PC3. Tratamento 2,4-D e suas três réplicas como mesocosmos: D1, D2 e D3: **c)** PC1 versus PC2; e **d)** PC1 versus PC3. Tratamento Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos F1, F2 e F3: **e)** PC1 versus PC2; e **f)** PC1 versus PC3. Tratamento da mistura de 2,4-D e Fipronil e suas três réplicas como mesocosmos M1, M2 e M3: **g)** PC1 versus PC2; e **h)** PC1 versus PC3. As variáveis Mn=manganês, Ba= bário, Sr= estrôncio, K= potássio e Cu= cobre contribuíram para a PC1. As variáveis Pb= chumbo, Ni= níquel, Zn= zinco, Co= cobalto e Mo= molibdênio contribuíram para a PC2. As variáveis Zn, Ni, Mo, Co e Cd= cádmio contribuíram para a PC3. “t0”, “t14” e “t73” são os dias 0, 14 e 73 da coleta referente ao dia da contaminação (0 dias). “+” significa que a PC está relacionada positivamente a variável. “-” significa que a PC está relacionada negativamente a variável.

**APÊNDICE B**  
**MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 2**





**Apêndice B1.** Gráficos dos resíduos do modelo linear misto final (modelo com menor critério de informação de Akaike/ *Akaike information criterion* corrigido para amostras-pequenas (AICc)) da variável resposta abundância de Cladocera: residuals versus theoretical quantiles= gráfico envelope da probabilidade da normalidade dos resíduos; e residuals versus index= resíduos versus valores dos resíduos ajustado para a observação da heterocedasticidade dos resíduos.



**Apêndice B2.** Gráficos dos resíduos do modelo linear final (modelo com menor critério de informação de Akaike/ *Akaike information criterion* corrigido para amostras-pequenas (AICc)) da variável resposta abundância de Copepoda: residuals versus theoretical quantiles= gráfico envelope da probabilidade da normalidade dos resíduos; e residuals versus index= resíduos versus valores dos resíduos ajustado para a observação da heterocedasticidade dos resíduos.









***EESC • USP***