

CARINA PEREIRA COTTA

**IMPACTOS DOS AGROTÓXICOS FIPRONIL E 2,4-D E DA VINHAÇA DA
CANA-DE-AÇÚCAR, ISOLADAMENTE E EM MISTURA, SOBRE A
COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS: UM ESTUDO
EM MODELOS ECOSSISTÊMICOS**

São Carlos
2022

CARINA PEREIRA COTTA

**Impactos dos agrotóxicos Fipronil e 2,4-D e da vinhaça da cana-de-açúcar,
isoladamente e em mistura, sobre a comunidade de macroinvertebrados
bentônicos: um estudo em modelos ecossistêmicos**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Dra. Raquel Aparecida Moreira
Versão CORRIGIDA

São Carlos
2022

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

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

P846i Pereira Cotta, Carina
IMPACTOS DOS AGROTÓXICOS FIPRONIL E 2,4-D E DA VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR, ISOLADAMENTE E EM MISTURA, SOBRE A COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS: UM ESTUDO EM MODELOS ECOSSISTÊMICOS / Carina Pereira Cotta; orientadora Raquel Aparecida Moreira. São Carlos, 2022.

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

1. Regent® 800 WG. 2. DMA® 806 BR. 3. mistura. 4. composição taxonômica. 5. índices ecológicos. 6. diversidade funcional. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **CARINA PEREIRA COTTA**.

Título da dissertação: "Impactos dos agrotóxicos Fipronil e 2,4-D e da vinhaça da cana-de-açúcar, isoladamente e em mistura, sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos: um estudo em modelos ecossistêmicos".

Data da defesa: 13/12/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

Dra. **Raquel Aparecida Moreira**

(Orientadora)

(Pós-Doutoranda/EESC-USP)

Aprovada

Prof. Associado **Juliano José Corbi**

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovada

Profa. Dra. **Odete Rocha**

(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

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

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Dedico este trabalho à minha mãe, minha parceira de vida, minha força e meu suporte em tudo, e à memória do meu pai, meu maior incentivador e a pessoa que mais acreditava no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a orientação, paciência, compreensão e persistência que a Raquel Aparecida Moreira e o Thandy Júnio da Silva Pinto me proporcionaram durante a realização deste trabalho, sem os quais essa jornada seria impossível e inalcançável. Também agradeço ao querido Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola pela oportunidade. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, a qual tenho profundo agradecimento também.

Meu agradecimento também a toda equipe do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA) que contribuíram e participaram de alguma forma da construção inicial desse trabalho, meu obrigada a Maria Paula C. Yoshii, Laís C. M. Silva, Allan P. Ogura, Gabriele V. de Mello Gabriel, Luiz C. Schiesari, Janaina B. do Carmo, Cassiana C. Montagner, e todos do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA) pelo acolhimento, mesmo que breve.

Agradeço à professora Dra. Odete Rocha e todos do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE/UFSCar), obrigada Luizinho, Diego, Kaue e Edna, por me acolherem, ajudarem e me permitirem compartilhar das dependências do laboratório em tempos pandêmicos para dar continuidade a este trabalho.

Agradeço grandemente também as amigadas que fiz, Nayara, Edmilson e Renan, os quais ingressaram no programa junto de mim, onde fomos suporte e incentivo uns dos outros. Também agradeço aos meus amigos de longa data, os quais foram essenciais na minha jornada do início até este presente momento, meu amigo/irmão Felipe que nunca mediu esforços para ser presente, apoiar e ser instrumento de Deus em minha vida, a minha amiga Camila Praça por me abrir portas no momento mais inesperado, a Flaviana Candeias e Jaqueline Carolino por compartilhar da vida de mestrandas em meio a crise pandêmica e ser uma rede de apoio umas das outras, a Bruna Maira por ter sido um dos maiores presentes em 2021, sem a qual muitas coisas teriam sido impossíveis.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a toda minha família por todo apoio, incentivo e amor de sempre, em especial minha mãe Vera, meu irmão Caio, minha avó Maria, meu falecido pai Nabor e nosso querido Oscar. Um obrigada especial ao meu namorado e amigo Vinícius por dentre muitas coisas, a força imprescindível nos momentos difíceis desde sempre. E o principal, agradecimento constante e eterno a Deus pela vida e tudo que vem com ela. Ele sabe de tudo, e tudo posso Nele que me fortalece.

RESUMO

COTTA, C. P. **Impactos dos agrotóxicos Fipronil e 2,4-D e da vinhaça da cana-de-açúcar, isoladamente e em mistura, sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos: um estudo em modelos ecossistêmicos.** 2022. Dissertação (Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental – Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2022).

Agrotóxicos atingem ecossistemas aquáticos e causam impactos negativos em diversos organismos não alvos. A cana-de-açúcar é uma das principais monoculturas no Brasil, e o herbicida 2,4-D e o inseticida fipronil se destacam como um dos seus principais ingredientes ativos utilizados. A vinhaça também é extensivamente utilizada nessa plantaçao. Esses compostos no ambiente aquático potencializam os efeitos deletérios nos organismos. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a composição, abundância e diversidade funcional da comunidade de macroinvertebrados bentônicos, bem como sua capacidade de reestabelecimento frente à contaminação ambiental pelos agrotóxicos Regent[®] 800WG (ingrediente ativo - i. a. fipronil) (F) e DMA[®] 806BR (i.a. 2,4-D) (D) e da vinhaça (V), isoladamente e em misturas: dos agrotóxicos - M e dos três contaminantes - MV. O estudo foi conduzido utilizando mesocosmos ao ar livre. A comunidade de macroinvertebrados foi monitorada por meio de estruturas de colonização, sendo avaliados os efeitos dos contaminantes ao longo do tempo de exposição em 1, 7, 14, 28, 75 até 150 dias. A contaminação ambiental foi simulada com aplicação de doses recomendadas. Foram observadas alterações na composição da comunidade. A família Chironomidae e subclasse Oligochaeta mostraram-se mais sensíveis ao tratamento V e MV, enquanto as famílias Phoridae, Ephydriidae e Sciomyzidae foram pontualmente encontradas nesses tratamentos. Os insetos foram sensíveis aos tratamentos F e M. Para os grupos funcionais alimentares, a comunidade de macroinvertebrados se caracterizou pela maior proporção de coletores-catadores. Os predadores, compostos por insetos, desapareceram nos tratamentos F e M. Por outro lado, em V e MV foi observado o desaparecimento dos coletores-catadores, que posteriormente se reestabeleceram. Nesse cenário realístico de contaminação, considerando o papel importante dos macroinvertebrados, o funcionamento ecossistêmico pode ser realmente afetado.

Palavras-chave: Regent[®] 800 WG. DMA[®] 806 BR. Mistura. Composição taxonômica. Índices ecológicos. Diversidade funcional.

ABSTRACT

COTTA, C. P. **Impacts of Fipronil and 2,4-D pesticides and sugarcane vinasse, isolated and in mixture, on the benthic macroinvertebrate community: a study in ecosystem models.** 2022. Dissertação (Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental – Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2022).

Pesticides reach aquatic ecosystems and cause negative impacts on several non-target organisms. Sugarcane is one of the main monocultures in Brazil, and the herbicide 2,4-D and the insecticide fipronil stand out as one of its main active ingredients used. The vinasse stands out being extensively used in this plantation. These compounds occurring in the aquatic environment can potentiate the deleterious effects on organisms. Thus, the objective of this study was to evaluate the composition through ecological indices, abundance and functional diversity of the benthic macroinvertebrate community, as well as its ability to reestablish itself in the face of environmental contamination by the pesticides Regent[®] 800WG (active ingredient – a.i. fipronil) (F) and DMA[®] 806BR (a.i. 2,4-D) (D) and vinasse (V), alone and in mixtures: pesticides - M and the three contaminants - MV. The study was conducted using open-air mesocosms. The macroinvertebrate community was monitored through colonization structures, and the effects of contaminants were evaluated over the exposure time in 1, 7, 14, 28, 75 to 150 days. Environmental contamination was simulated with the application of recommended doses. Changes were observed in the composition of the community. The family Chironomidae and subclass Oligochaeta were more sensitive to the treatment V and MV, while the families Phoridae, Ephydriidae and Sciomyzidae were occasionally found in this treatment. The insects were sensitive to treatments F and M. About functional food groups, the macroinvertebrate community was characterized by the highest proportion of collectors-gatherers. Predators, composed of insects, disappeared in treatments F and M. On the other hand, in V and MV, the disappearance of collectors-gatherers was observed, which later reestablished. In this realistic scenario of contamination, considering the important role of macroinvertebrates, ecosystem functioning can be really affected.

Keywords: Regent[®] 800 WG. DMA[®] 806 BR. Mixture. Taxonomic composition. Ecological indices. Functional diversity.

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: CONTEXTUALIZAÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA

Figura 1: Macroinvertebrados bentônicos representantes da fauna de água doce.....20

Figura 2: Ordens de macroinvertebrados bentônicos bioindicadores da qualidade da água.....24

Figura 3: Esquema representativo da comparação entre bioensaios de laboratório, modelos ecossistêmicos e experimentos de campo.....28

Figura 4: Modelos de ambientes simulados em mesocosmos.....29

CAPÍTULO 2: EXPOSIÇÃO REALISTA AO FIPRONIL, 2,4-D E VINHAÇA INFLUENCIA A ESTRUTURA TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA ASSEMBLEIA DE MACROINVERTEBRADOS

Figura 1: Estruturas de colonização e mesocosmos (A); descarte de mesocosmos ao ar livre (B); tréplica de mesocosmo contaminada com mistura de maior escala (C).....47

Figura 2: Curva de resposta principal das variáveis físico-químicas (a) e dos macroinvertebrados bentônicos (b) de mesocosmos controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de agrotóxicos (M), vinhaça (V) e mistura de pesticidas com vinhaça (MV) durante um período de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação.....54

Figura 3: Índices de diversidade para dominância (a), riqueza de espécies (b), Shannon (c) e Simpson (d) de controle de mesocosmos (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de pesticidas (M), vinhaça (V) e mistura de agrotóxicos com vinhaça (MV) durante um período de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação.....58

Figura 4: Abundância relativa para os tratamentos controle (a), 2,4-D (b), fipronil (c), mistura de agrotóxicos (d), vinhaça (e) e mistura de agrotóxicos com vinhaça (f) durante um período de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação.....60

Figura 5: Diversidade funcional de macroinvertebrados bentônicos para os tratamentos controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de agrotóxicos (M), vinhaça (V) e mistura

de agrotóxicos com vinhaça (MV) durante um período de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14)), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação.....62

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 2: EXPOSIÇÃO REALISTA AO FIPRONIL, 2,4-D E VINHAÇA INFLUENCIA A ESTRUTURA TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA ASSEMBLEIA DE MACROINVERTEBRADOS

Tabela 1: Concentrações médias de agrotóxicos ao longo do tempo ($\mu\text{g L}^{-1}$). As abreviaturas correspondem às moléculas de fipronil (F), sulfeto de fipronil (Fd) e fipronil sulfona (Fn). Os tratamentos são controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de agrotóxicos (M), vinhaça (V) e mistura de agrotóxicos com vinhaça (MV). LOQ = Limite de Quantificação.....52

Tabela 2: Concentrações (média \pm SE) de metais em água (mg L^{-1}) dos mesocosmos de controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de agrotóxicos (M), vinhaça (V) e mistura de agrotóxicos com vinhaça (MV) em amostras coletadas após contaminação.....53

Tabela 3: Regressão múltipla de índices ecológicos de dominância, diversidade de Shannon, riqueza de famílias e abundância de organismos, aplicados em relação a parâmetros físico-químicos medidos na água do mesocosmo ao longo do tempo. Os valores dos coeficientes β (pesos) de cada variável adicionada ao modelo ($p < 0,05$) são apresentados ao lado da equação. Onde OD - oxigênio dissolvido, NT - nitrogênio total (mg L^{-1}), Turb - Turbidez (NTU), Cond - Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$), Fip - concentração de fipronil ($\mu\text{g L}^{-1}$) e Clo a - clorofila uma concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$).....57

Tabela S1: Número médio de famílias de macroinvertebrados bentônicos nos mesocosmos controle (C), 2,4-D (D) e fipronil ao longo do tempo de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação. A classificação dos Grupos de Alimentos Funcionais (FFG) foi separada em coletores-coletores (GC), filtradores (FF), filtros-coletores (FC), raspadores (Sc), trituradores (Sh) e predadores (Pr).....85

Tabela S2: Caracterização físico-química da vinhaça pura adaptada de Pinto et al (2021).....87

Tabela S3: Média das variáveis ambientais das amostras dos tratamentos dos mesocosmos de controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de defensivos (M), vinhaça (V) e mistura de defensivos com vinhaça (MV) ao longo do tempo, 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da

contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a
contaminação.....88

Sumário

CAPÍTULO 1: CONTEXTUALIZAÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA	12
1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. SÍNTESE DA LITERATURA FUNDAMENTAL.....	15
3.1. VINHAÇA DA CANA DE AÇÚCAR	15
3.2. AGROTÓXICOS (2,4-D E FIPRONIL).....	17
3.3. MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS.....	19
3.3.1. CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS E FUNCIONAIS	19
3.3.2. MACROINVERTEBRADOS COMO BIOINDICADORES	22
3.4. ÍNDICES ECOLÓGICOS.....	26
3.5. ESTUDO EM MODELOS ECOSSISTÊMICOS	27
4. OBJETIVO GERAL	30
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5. HIPÓTESES.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO 2: EXPOSIÇÃO REALISTA AO FIPRONIL, 2,4-D E VINHAÇA INFLUENCIA A ESTRUTURA TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA ASSEMBLEIA DE MACROINVERTEBRADOS.....	44
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1. DESENHO EXPERIMENTAL.....	46
2.2. COLETA E ANÁLISE DA COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS	47
2.3. COMPOSIÇÃO, ÍNDICES ECOLÓGICOS E DIVERSIDADE FUNCIONAL DA COMUNIDADE.....	48
2.4. ANÁLISES DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS, METAIS E CONTAMINANTES	49
2.5. ANÁLISE DE DADOS.....	49
3. RESULTADOS	50
3.1. DESCRIÇÃO DOS CONTAMINANTES	50
3.1.1. VINHAÇA	50
3.1.2. AGROTÓXICOS	51
3.1.3. METAIS.....	53
3.2. VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA	53
3.3. COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS	55
3.3.1. COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE.....	55

3.3.2. ÍNDICES ECOLÓGICOS, ABUNDÂNCIA E ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA.....	56
3.3.3. DIVERSIDADE FUNCIONAL DA COMUNIDADE	61
4. DISCUSSÃO.....	63
4.1. QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA E CONCENTRAÇÕES DE PESTICIDAS	63
4.2. EFEITOS NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS.....	65
4.3. MUDANÇAS NA DIVERSIDADE FUNCIONAL DA COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS.....	70
5. CONCLUSÃO	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICE A	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93

CAPÍTULO 1: CONTEXTUALIZAÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das maiores monoculturas cultivadas no Brasil, sendo, portanto, a segunda lavoura que mais deve expandir em termos de área na próxima década (Rodrigues et al., 2018) e, devido à queda no preço do açúcar, a tendência para os próximos anos é um direcionamento do setor para a produção de etanol (MAPA, 2017). Apesar de apresentar importantes vantagens ambientais e econômicas em comparação ao uso de outras matérias-primas, a indústria sucroalcooleira brasileira ainda requer adequação ambiental em termos de manejo adequado da vinhaça, principal efluente da produção de etanol (CGEE, 2008). A vinhaça consiste em um efluente de coloração marrom-escura, tendo como característica altas concentrações de matéria orgânica, nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio) e compostos ácidos (Fuess; Garcia, 2014, España-Gamboa et al., 2011), sendo um subproduto do processo de fabricação de etanol por meio da destilação do caldo fermentado da cana-de-açúcar (Corazza, 2006).

Alguns estudos tem revelado elevados teores de metais em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar (Fuess et al., 2017), de forma que na literatura, em geral tem-se encontrado valores de metais em águas residuais proveniente de fertirrigação maiores em comparação com valores de referências presentes em instruções normativas e legislação (WHO, 2006). Por esse motivo, é necessário conhecer os efeitos negativos que este resíduo pode causar ao serem carregados para ambientes aquáticos, de forma a encontrar ferramentas para eliminar ou reduzir a possível toxicidade provocada nesses ecossistemas (Botelho, 2013). Além disso, buscando traçar novas estratégias e tecnologias para maximizar a produção, a agricultura tem optado cada vez mais pelo uso de insumos agrícolas, como por exemplo, agrotóxicos e fertilizantes (Lopes; Contini et al., 2012). Entre os agrotóxicos utilizados na cana-de-açúcar, o inseticida fipronil e o herbicida 2,4-D se destacam (CETESB, 2010). Neste sentido, os ambientes aquáticos, receptores intermediários ou finais de atividades antrópicas, são considerados ambientes amplamente ameaçados nos últimos tempos (Padsák et al., 2000), sendo afetados direta ou indiretamente pelo uso de agrotóxicos utilizados na culturas, trazidos pelo escoamento superficial, lixiviação e até mesmo pela ação do vento ou aplicação aérea dos mesmos,

uma vez que, muitas áreas de cultivo apresentam em suas proximidades corpos d'água (Américo et al., 2015; Bortolozo et al., 2016; Ulrich et al., 2013).

Uma vez no ambiente aquático, os agrotóxicos podem causar efeitos adversos nas comunidades biológicas autóctones. Os organismos expostos aos agrotóxicos, podem apresentar alterações nas suas condições mínimas de sobrevivência, tais como morfológicas, fisiológicas, comportamentais, reprodutivas, dentre outras, ou mesmo tal exposição podem levar a morte (Willis; McDowell, 1982). A presença dessas substâncias nos ambientes naturais ocorre simultaneamente, de forma que estas podem variar ao longo do tempo em termos de concentração e composição (Herbrandson et al., 2003), podendo causar efeitos deletérios mais severos do que quando os compostos ocorrem de forma isolada (Barata et al., 2006; Phyu et al., 2011; Silva et al., 2015; Moreira et al., 2017; Moreira et al., 2020b; Moreira et al., 2020a). Neste contexto, macroinvertebrados bentônicos se destacam como importantes organismos para avaliação da qualidade da água e de impactos ambientais (Resh; Rosenberg, 1989), uma vez que, apresentam elevada sensibilidade às variadas condições ambientais, bem como, contribuem na cadeia alimentar e ciclagem de nutrientes (Ligeiro et al., 2013). Algumas espécies de macroinvertebrados, por serem intolerantes à poluição, podem estar ausentes em ambientes onde a qualidade da água ou habitat estiverem degradados (Pignata et al., 2013).

Dessa forma, estudos ecológicos que utilizam a comunidade de macroinvertebrados como bioindicadores, tem considerado cada vez mais a classificação por grupos funcionais alimentares como abordagem, uma vez que, as adaptações alimentares são consideradas conforme os diferentes recursos e a forma como estes são processados (Duan et al., 2011), destacando esses organismos como espécies-chaves utilizadas individualmente como sentinelas nas avaliações ecotoxicológicas (Pinto, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

A cana-de-açúcar é uma das maiores monoculturas cultivadas no Brasil. Em termos de produção, foi utilizado cerca de 9 milhões de hectares de área plantada para a safra de 2016/2017. Projeções para as safras 2029/2030 preveem um aumento de 2 milhões de hectares sendo, portanto, a segunda lavoura que mais deve expandir em termos de área na próxima década, ficando apenas atrás da soja (Rodrigues et al., 2018).

O setor sucroalcooleiro do país apresenta estimativas de crescimento na produção de 52,8 milhões de toneladas para a próxima década, sendo um acréscimo de 36,4% em relação a 2016/2030. Por outro lado, de acordo com o relatório OCDE-FAO (2015), a falta de investimento no setor e condições climáticas em constante mudanças, ocasionaram produtividades médias mais baixas recentemente, resultando em quedas no preço do açúcar. Com a queda no preço do açúcar, de acordo com técnicos do setor de agroenergia do MAPA (2017), a tendência para os próximos anos é um direcionamento da produção para o etanol.

Entretanto, adequação ambiental em termos de manejo adequado da vinhaça, principal efluente da produção de etanol, são necessários (CGEE, 2008). Neste sentido, encontra-se na literatura valores de metais em águas residuais proveniente de fertirrigação maiores em comparação com valores de referências presentes em instruções normativas e legislação (WHO, 2006), e portanto, apesar de a comunidade científica discutir frequentemente a necessidade de se reduzir a carga poluente da vinhaça, ainda em termos jurídicos e técnicos, pouco conteúdo crítico é apresentado descrevendo os efeitos da mesma no meio ambiente e ecossistemas (Fuess; Garcia, 2015; Guerreiro et al., 2016; Moran-Salazar et al., 2016).

Além disso, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e etanol (FAO, 2019), e esse tipo de cultura é demasiadamente dependente do controle químico para a manutenção das plantações, ocupando o segundo lugar do *ranking* das culturas que mais se aplica agrotóxicos, seguido da soja (Caldarelli & Gilio, 2018). Dentre os agrotóxicos utilizados na cana-de-açúcar, o 2,4-D e o fipronil estão entre os compostos mais frequentemente utilizados (CETESB, 2010). A ação tóxica desses compostos muitas vezes acaba sendo exercida em organismos não alvos (Carvalho, 2017), e na maioria das vezes, a presença dessas substâncias nos ambientes naturais ocorrerem simultaneamente (Herbrandson et al., 2003), tornando-se cada vez mais importante estudos que avaliem os efeitos ecotoxicológicos de misturas de agrotóxicos aos organismos (Barata et al., 2006; Phyu et al., 2011; Silva et al., 2015; Moreira et al., 2017).

Quando os agrotóxicos atingem o ecossistema aquático, eles são distribuídos pelos diferentes compartimentos, e a adsorção aos sedimentos pode diminuir a biodisponibilidade para organismos que vivem na coluna de água, mas aumenta sua biodisponibilidade para a comunidade bentônica que vive e se alimenta dessa matriz

contaminada (Brennan et al., 2009). Os macroinvertebrados bentônicos têm sido considerados um grupo taxonômico importante e eficaz para a avaliação da toxicidade de agrotóxicos, principalmente porque estão expostos a produtos químicos tanto por meio de água contaminada quanto por sedimentos (Morais et al., 2019). Além disso, esses organismos podem se desenvolver por muitos anos em um ambiente, de forma que a diversidade e o tamanho das suas populações podem refletir a integração que seu ciclo de vida tem com todas as condições ambientais do meio, como os efeitos de poluentes e as suas combinações (Pignata et al., 2013).

3. SÍNTESE DA LITERATURA FUNDAMENTAL

3.1. VINHAÇA DA CANA DE AÇÚCAR

A vinhaça é um subproduto do processo de fabricação de etanol por meio da destilação do caldo fermentado da cana-de-açúcar (Corazza, 2006), e consiste em uma água residual marrom-escura com altas concentrações de matéria orgânica e compostos ácidos (Fuess; Garcia, 2014, Espanha-Gamboa et al, 2011). Apesar de apresentar importantes vantagens ambientais e econômicas em comparação ao uso de outras matérias-primas, a indústria sucroalcooleira brasileira ainda requer adequação ambiental em termos de manejo adequado da vinhaça, principal efluente da produção de etanol (CGEE, 2008).

No Brasil, a fertirrigação é caracterizada como uma das principais formas de manejo da vinhaça e o uso direto dessa água residuária na agricultura tem-se tornado cada vez mais comum (Fuess et al., 2017). Apesar disso, o uso da vinhaça na agricultura apresenta desvantagens considerando aspectos ambientais, uma vez que a vinhaça apresenta características poluentes e seu descarte contínuo nas lavouras de cana-de-açúcar gera diversos efeitos negativos sobre os solos e os recursos hídricos (Fuess; Garcia, 2014).

Devido à sua alta concentração de matéria orgânica, quando em contato com o solo em quantidade maior do que a capacidade do mesmo em reter íons, processos de lixiviação por escoamento superficial desses íons para os ambientes aquáticos podem ocorrer, ocasionando a proliferação de microrganismos, diminuição de oxigênio dissolvido na água, bem como impactos sobre a fauna e flora aquáticas (Botelho, 2013). Além disso, altos teores de matéria orgânica são responsáveis por causar diminuição de oxigênio devido a biodegradação heterotrófica que ocorre nas águas superficiais

(Korndorfer; Anderson, 1997). Estudo como o de Gunkel et al. (2007) apresentou que a biodegradação da matéria orgânica do rio Ipojuca levou a uma alta taxa de mineralização, apresentando baixas concentrações de oxigênio no curso geral da água, à medida que a DBO aumentava.

Em relação ao pH da vinhaça, estudos como o de Wilkie et al. (2000) indicaram alteração nas propriedades físico-químicas de solos, rios e lagos e efeitos adversos da biota em geral desses locais, associados a valores baixos de pH da vinhaça. Botelho et al. (2012) identificou que a vinhaça em pH baixo apresentou 100% de mortalidade nas concentrações 1,04%, 1,56% e 2,08% para *C. dubia*, e concentração de 1,04% para *D. magna*, as quais apresentaram 100% de mortalidade na concentração de 4,16% e 8,34% quando o pH foi ajustado, respectivamente, diminuindo a toxicidade do ambiente em pH mais elevado. No mesmo estudo, as concentrações 0,78% e 1,56% também foram estudadas e apresentaram 35% e 100% de mortalidade respectivamente antes do ajuste do pH, as quais apresentaram nenhum afeito após o ajuste. Além disso, considerando a maior solubilidade de metais em condições ácidas (WHO, 2006) o baixo pH da vinhaça pode aumentar a solubilidade dos metais no solo (Souza et al., 2013).

Alguns estudos tem revelado elevados teores de metais em amostras de vinhaça de cana-de-acúcar, podendo-se destacar elementos fitotóxicos, como Alumínio e Ferro, bem como, poluentes prioritários como Cádmio, Cromo, Cobre, Chumbo, Níquel e Zinco (Fuess et al., 2017). Metais não-essenciais, como Cádmio por exemplo, podem bioacumular ou biomagnificar ao longo da cadeia trófica, podendo afetar os seres humanos (Ruangsomboon; Wongrat, 2006).

Em geral, encontra-se na literatura valores de metais em águas residuais proveniente de fertirrigação maiores em comparação com valores de referências presentes em instruções normativas e legislação (WHO, 2006). Em amostras de melaço da vinhaça, Nandan et al. (1990) relataram níveis altos de 8,8 mgL⁻¹ para Pb, 15,7 mgL⁻¹ para Cobre e 11,8 mgL⁻¹ para Zn. Considerando amostras de melaço de vinhaça em processamento, Chandra et al. (2008), identificou níveis altos de concentração em mgL⁻¹ para metais como Cádmio, Chumbo, Níquel, Zinco e Cobre. Outros autores, como Tchobanoglous et al. (2003), evidenciaram em análise geral, que em todas as suas amostras de vinhaça, concentrações para Cobre, Cromo, Níquel e Zinco atingiram níveis acima dos limites de descarga de água tidos como valores de referência.

Apesar disso, normativamente ainda é pouco apresentado conteúdos que descrevam os efeitos da vinhaça e que determinem concentrações de metais provenientes dela que sejam aceitáveis nos ecossistemas (Fuess; Garcia, 2014; Guerreiro et al., 2016; Moran-Salazar et al., 2016). Autores como Pinto et al. (2020), evidenciaram diminuição na sobrevivência, reprodução e alterações no comportamento natatório e sexual da espécie de macroinvertebrado *H. meinerti*, com uma concentração de vinhaça correspondente à 1,3% (v/v). Além disso, Fraga et al. (2020) observaram efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento de larvas de *C. sancticaroli* e na reprodução e biomassa da oligochaeta *Allonais inaequalis*, além da bioacumulação de metais por ambas as espécies, com a mesma amostra de vinhaça em diluições menores que 1% (v/v). Mortalidade do peixe *Oreochromis niloticus* devido a toxicidade da vinhaça em concentrações acima de 5% de diluição, também foi identificado no estudo realizado por Correia et al. (2017), e nestes mesmos organismos, efeitos nos fígados em concentrações menores foram identificados por Marinho et al. (2014). Efeitos genotóxicos foram causados por concentrações inferiores (1% e 2%) a 5% de vinhaça, conforme apresentado no estudo realizado por Garcia et al. (2017), em relação aos danos presentes em cromossomos de *Allium cepa*.

3.2. AGROTÓXICOS (2,4-D E FIPRONIL)

Considerando que o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos e também o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e etanol (OCDE-FAO, 2019), para esse tipo de cultura, dentre os agrotóxicos utilizados, destacam-se como princípios ativos mais aplicados o inseticida fipronil e o herbicida 2,4-D (CETESB, 2010). O 2,4-D é um herbicida que pertence ao grupo químico ácido ariloxialcanóico e age de forma sistêmica como um inibidor de crescimento em plantas. O 2,4-D já foi encontrado em ambientes aquáticos próximos às plantações de cana-de-açúcar em concentrações ambientais que variam de 175,1 a 366,6 mgL⁻¹ (CETESB, 2018).

Já o Fipronil, é um inseticida que faz parte do grupo químico conhecido como pirazol e age como um forte bloqueador da regulação de íons de cloro por meio dos receptores GABA (g-canais de cloreto de ácido aminobutírico) em insetos, agindo diretamente no sistema nervoso dos organismos (Tomlin, 1994), e além disso, este apresenta alta taxa de degradação e consiste em um inseticida sistêmico utilizado na forma granular apresentando metabólitos altamente tóxicos como o fipronil sulfona, sulfeto,

amida e desulfinil (Chatterjee; Gupta, 2010; Mandal; Singh, 2013; Simon-Delso et al., 2015; Ramasubramanian; Paramasivam, 2017). O fipronil, por sua vez, foi detectado em concentrações observadas variando de 6 a 465 mgL⁻¹ em ambientes aquáticos próximos de plantações de cana-de-açúcar (CETESB, 2018).

Ambos os agrotóxicos também são utilizados em culturas como arroz, milho, soja e trigo, de forma que corpos d'água presentes ao entorno dessas culturas também já apresentaram concentrações variando de 0,7 a 153 mgL⁻¹ para o fipronil (Fang et al., 2019) e de 0,062 a 12 mgL⁻¹ para o 2,4-D (Islama et al., 2018).

O estudo realizado por Ruiz de Arcaute et al. (2016), evidenciou que o 2,4-D pode causar efeitos letais e subletais para diversas espécies, como evidenciado na espécie de peixe *Cnesterodon decemmaculatus* onde o valor de concentração letal para 50% da população (CL₅₀) foi de 1008 mgL⁻¹. Autores como Özkul et al. (2016) evidenciaram fitotoxicidade em raízes de *Allium cepa*, e outros como Hattab et al. (2015) constataram estresse oxidativo na minhoca *Eisenia andrei* em concentrações subletais. Outros como Freitas et al. (2019), evidenciaram que o herbicida prejudicou o crescimento, desenvolvimento, respiração e desempenho natatório de girinos quando expostos as concentrações de 0,125 mgL⁻¹.

Não muito diferente, diversos estudos ecotoxicológicos já têm demonstrado efeitos relacionados ao inseticida fipronil. Autores como Weston e Lydy (2014) por exemplo, avaliaram o impacto do fipronil em macroinvertebrados bentônicos, concluindo que com CL₅₀ de 32,5 µgL⁻¹ a espécie *Chironomus dilutus* se apresentou como a mais sensível dentre as espécies utilizadas. Efeitos subletais do fipronil em enzimas do peixe *Danio rerio* foram identificados por WU et al. (2014), além de obterem CL₅₀ de 0,220 mgL⁻¹ para a espécie.

Além disso, a presença dessas substâncias em ambientes naturais ocorre simultaneamente, os quais já foram detectados em mistura em corpos hídricos do Estado de São Paulo (CETESB, 2018), de forma que estas podem variar ao longo do tempo em termos de concentração e composição (Herbrandson et al., 2003). Neste sentido, estudos que avaliam os efeitos ecotoxicológicos de misturas de agrotóxicos nos organismos têm se apresentado cada vez mais importante (Barata et al., 2006; Phyu et al., 2011; Silva et al., 2015; Moreira et al., 2017).

Moreira et al. (2020b) avaliaram os efeitos fisiológicos, morfológicos e bioquímicas do 2,4-D e do fipronil em *Raphidocelis subcapitata*, evidenciando que mesmo o 2,4-D em baixas concentrações pode interagir com o fipronil aumentando assim as taxas de biotransformação e toxicidade do inseticida nas algas, bem como, diminuição da densidade e taxa de crescimento da *R. subcapitata* quando exposta à ambos os contaminantes. Em outro estudo, realizado por Moreira et al, 2020c, *Ceriodaphnia silvestrii* foi afetado quando exposto à condições realistas, com efeitos de predador (através de *kairomones*) e exposição de fipronil combinado com o pesticida 2,4-D, evidenciado que um tóxico pode interferir na tolerância do organismo em relação ao outro. No estudo de Silva et al. (2020) foi observado antagonismo para a reprodução de *C. silvestrii* expostos às formulações de fipronil e 2,4-D. Por outro lado, para os testes de toxicidade aguda, ocorreu antagonismo para *C. silvestrii* em doses menores que os valores de CE₅₀ de fipronil e 2,4-D, e sinergismo em doses maiores (Silva et al., 2020).

Desta forma, é essencial que estudos sobre os efeitos combinados sejam conduzidos a fim de que seus resultados possam contribuir para uma avaliação de risco mais completa e acurada desses compostos nos ambientes naturais.

3.3. MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS

3.3.1. CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS E FUNCIONAIS

A comunidade de macroinvertebrados bentônicos apresenta grande diversidade morfológica que é proporcionada pela diversidade de Filos (Figura 1), os quais são representados organismos como poríferos, platelmintos, nematodos, anelídeos, moluscos e artrópodos (Hauer & Resh, 1996, Covich et al., 1999; Silveira et al., 2004). Os artrópodos são os mais diversificados, destacando-se os insetos aquáticos (Hynes, 1970; Lake, 1990). Os macroinvertebrados são organismos que pertencem à uma fauna de invertebrados cujo tamanho possibilita que sejam retidos por uma peneira ou rede de malha de 500 µm, quando na fase adulta (HAUER; RESH, 2006). Esses organismos são geralmente maiores que 0,5 mm (Cummins et al., 1989) e pelo menos parte do seu ciclo de vida passam habitando nos sedimentos de ecossistemas lênticos ou lóticos, que apresentem disponibilidade de substratos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos (Rosenberg, 1998; Goulart & Callisto, 2003).

Figura 1: Macroinvertebrados bentônicos representantes da fauna de água doce.



Fonte: Biojurc (2014)

Os macroinvertebrados bentônicos podem ser classificados em algumas categorias, como organismos haptobênticos ou perifíticos verdadeiros, os quais vivem atracados a substrato sólido, também na categoria organismos de vida livre no haptobento que possuem capacidade de se movimentar representados por um grande número de espécies e grupos de pequenos artrópodos. Outra categoria se enquadra nos organismos com movimentos, maiores do que os de vida livre, porém sem habilidade natatória como os moluscos gastrópodes, alguns insetos e poucos crustáceos. Os organismos categorizados como nadadores são aqueles que se alimentam de organismos do sedimento e se deslocam em busca de recursos alimentares, como as sanguessugas, crustáceos e diversos insetos. Por outro lado, existem os organismos que vivem no lodo, como as larvas de insetos e oligochaetas por exemplo, que geralmente estão presentes em águas um pouco mais profundas e debaixo de vegetação. Por fim, a categoria dos organismos conhecidos como fauna de areia ou psamonbentos, os quais se desenvolvem nas regiões litorâneas em meio à mistura de líquido, sólido e ar (Mandaville, 1999).

São organismos que podem se desenvolver por muitos anos em um ambiente, de forma que a diversidade e o tamanho das suas populações podem refletir a integração que seu ciclo de vida tem com todas as condições ambientais do meio, como por exemplo, características físico-químicas da água e os efeitos de poluentes (Pignata et al., 2013). Além disso, a comunidade de macroinvertebrados bentônicos exerce muita importância para o sedimento, lagos e rios, pois atuam na dinâmica de nutrientes, fluxo de energia e na transformação da matéria atuam no metabolismo do ecossistema atuando na ciclagem de nutrientes e na redução do tamanho das partículas orgânicas, facilitando a ação de fungos e bactérias (Callisto & Esteves, 1995).

Uma comunidade biológica pode ser analisada de diversas maneiras, como densidade de espécies, teias alimentares, fluxo de energia, diversidade específica e alimentação (Silva et al., 2011). Além disso, diversos estudos ecológicos tem avaliado parte ou toda a comunidade de macroinvertebrados como bioindicadores considerando não somente uma abordagem taxonômica, mas também a classificação por grupos funcionais alimentares, uma vez que esta abordagem considera as adaptações alimentares dos macroinvertebrados tanto de acordo com os diferentes recursos nutricionais, bem como pela maneira pela qual eles o processam (Duan et al., 2011).

As características funcionais dos macroinvertebrados utiliza uma abordagem de grupo de alimentação funcional (GAF) desenvolvida baseada em uma técnica de classificação alternativa que analisa funcionalmente a técnica de alimentação de macroinvertebrados de riachos atrelada as suas adaptações morfo-comportamentais para aquisição de alimentos (Merritt et al., 2017).

Esse formato de classificação foi descrito a mais de 40 anos (Cummins, 1973) e desde então alguns detalhes da técnica tem sido modificados (por exemplo, Cummins, 1974, Cummins e Klug, 1979, Wallace e Merritt, 1980, Merritt et al., 1984, Cummins e Wilzbach, 1985, Merritt et al., 1996, Merritt et al., 1999, Merritt et al., 2002, Merritt et al., 2008, Mattson et al., 2014). A base das relações dos GFAs consiste na relação direta entre as diferentes categorias de recursos nutricionais presentes no ambiente aquático e os organismos macroinvertebrados dotados de capacidades adaptadas para colher de forma eficiente um determinado recurso alimentar disponível (Merritt et al., 2017). Dessa forma, quando há alteração no espaço e no tempo da disponibilidade relativa desses

recursos, também ocorrem mudanças na abundância relativa desses grupos (Merriti et al., 2017).

Dessa forma, considerando o modo de alimentação dos macroinvertebrados bentônicos, esses organismos podem ser agrupados em cinco diferentes categorias (Silva et al., 2011) fragmentadores, coletores, catadores, raspadores, filtradores e predadores (Vannote et al., 1980). O grupo funcional de fragmentadores são caracterizados por utilizarem a matéria orgânica particulada grosseira (> 1mm) e materiais foliares mortos como fonte de alimento, sendo estes dependentes da biomassa microbiana associada.

Os organismos que desempenham papel de coletores, catadores e filtradores são responsáveis por utilizar a matéria orgânica particulada fina (50 µm-1mm) e ultrafina (0,5-50 µm) como alimento, as quais são filtradas da coluna d'água ou retiradas do sedimento. Esses grupos também são dependentes da biomassa microbiana que está associada às partículas, bem como, dependem dos produtos de metabolismo para comporem a sua nutrição. Os raspadores são caracterizados por organismos herbívoros capazes de raspar algas que se encontram aderidas às superfícies, e os predadores por sua vez, consistem em indivíduos que se alimentam de pequenos vertebrados e outros grupos de invertebrados (Vannote et al., 1980). Por outro lado, macroinvertebrados podem mudar seu modo de alimentação para se adaptar às alterações nas condições ambientais (Tomanova et al., 2006).

3.3.2. MACROINVERTEBRADOS COMO BIOINDICADORES

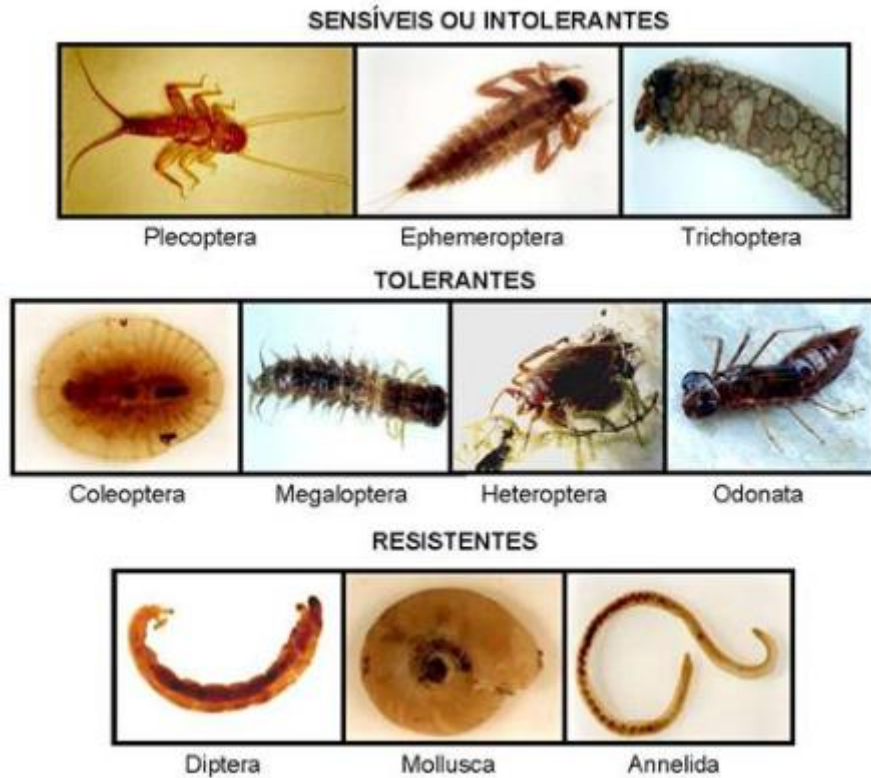
As comunidades bentônicas apresentam estreita relação com o ambiente em que vivem, de tal forma que fatores como temperatura, morfologia do ecossistema, oxigênio disponível, pH, disponibilidade e qualidade de alimentos, entre outros podem alterar características como composição, densidade e distribuição desses organismos (Vannote et al., 1980; Ward et al., 1995; Galdean et al., 2000; Bispo et al., 2006), os quais podem fletir o grau de integridade do ambiente (Kleine & Trivinho-Strixino, 2005).

Os fatores bióticos e abióticos podem exercer muitas influências sobre as comunidades aquáticas, pois os ambientes são complexos por apresentarem diversas interações entre os múltiplos processos que ocorrem entre as variáveis abióticas e as comunidades biológicas (Reynolds & Elliot, 2012). Da mesma forma, os macroinvertebrados bentônicos também sofre influência do meio devido a múltiplos

fatores denominados como fatores controladores (Hynes, 20021). Dentro diversos fatores controladores, pode-se destacar fatores como o ciclo de vida das espécies (Ezcurra de Drago et al., 2007), interações biológicas (Hynes, 2001), estado trófico do ambiente (Hynes, 2001; Smith, 2003), carga de detritos e tamanho das partículas orgânicas (Vannotte et al., 1980), oxigênio dissolvido (Diaz & Rosenberg, 1995). Esses fatores são muitas vezes responsáveis por controlar o funcionamento, estrutura e composição das comunidades aquáticas, especialmente as comunidades bentônicas (Van de Meutter et al., 2005).

Neste sentido, os macroinvertebrados bentônicos, por sua vez, podem expressar respostas a alterações nas condições ambientais de origem natural ou antropogênica e, portanto, são bastante utilizados como organismos bioindicadores de agentes estressores (Mangadze et al., 2016; Marzin et al., 2012; Sharma & Chowdhary, 2011). Além disso, muitas espécies dessa comunidade estão associadas a substratos específicos que oferecem diferentes fontes de alimento e abrigo (Schröder et al., 2013), podendo refletir respostas à impactos sofridos por outras comunidades aquáticas e habitat, como as algas e macrófitas que representam importante fontes de alimento e disponibilidade de raízes, caules e folhas (Pinilla, 2010). Além disso, os macroinvertebrados bentônicos são capazes de reagir a diferentes níveis e formas de poluição, e por essa razão, conforme a habilidade de relação frente ao estresse sofrido podem ser classificados como organismos tolerantes, intolerantes e organismos resistentes (Figuar 2) (Goulart & Callisto, 2003; Gonçalves & Aranha, 2004).

Figura 2: Ordens de macroinvertebrados bentônicos bioindicadores da qualidade da água.



Fonte: Callisto et al., (2008)

Os macroinvertebrados classificados como tolerantes, são pouco sensíveis à poluição, geralmente demandam menores concentrações de oxigênio dissolvido como algumas famílias de Diptera e geralmente representados por insetos aquáticos e organismos pertencentes as ordens Heteroptera, Odonata e Coleoptera (Goulart & Callisto, 2003). Os organismos considerados intolerantes correspondem aqueles que necessitam de altas concentrações de oxigênio dissolvido, representados por organismos cuja abundância é tida como parâmetro de qualidade da água, como os pertencentes as ordens Ephemeroptera, Trichoptera e Plecoptera (Rosenberg, 1998; Goulart & Callisto, 2003). Por fim, os macroinvertebrados classificados como resistentes são aqueles capazes de sobreviver de depleção de oxigênio dissolvido, além de viverem enterrados no sedimento e serem detritívoros, os quais facilmente se adaptam aos mais diversos ambientes, os quais podem-se destacar as larvas de Chironomidae, diversas espécies de Diptera e Oligochaetas (Goulart & Callisto, 2003; Gonçalves & Aranha, 2004).

A comunidade de macroinvertebrados bentônicos é fundamental para a dinâmica de nutrientes uma vez que propiciam a transformação de matéria e o fluxo de energia

(Callisto & Esteves, 1995), pois ao biorrevoerem a superfície do sedimento e fragmentarem matérias provenientes da vegetação ripária liberam nutrientes para a água e contribuem para a aeração dos sedimentos (Cummins et al., 1989; Devai, 1990), processos estes responsáveis pela saúde e qualidade de um corpo d'água.

Paralelo a isso, os ambientes aquáticos ao longo dos anos têm sido bastante afetados pelas variadas atividades antrópicas, as quais exercem estresse nos organismos presentes nessas áreas (DiI Veroli et al., 2010), e a biodiversidade do macroinvertebrados é colocada em risco com as extensas atividades agrícolas e o grande uso de agrotóxicos que chegam as águas superficiais e contaminam esses ecossistemas (Stehle & Schulz, 2015). Dessa forma, a tempos vem sendo utilizados como organismos indicadores para a avaliação de ecossistemas e sua integridade ecológica (Rosenberg, 1998; Goulart & Callisto, 2003; Gonçalves & Aranha, 2004).

Os macroinvertebrados bentônicos são ótimos bioindicadores pois podem ser afetados por perturbações em muitos habitats diferentes, possuem uma riqueza de espécies diversa, podem produzir muitas respostas, geralmente são de vida longa permitindo o acompanhamento das mudanças temporais de abundância e desenvolvimento da comunidade, além de demonstrarem condições do ecossistema ao longo do tempo, de forma a fornecer evidências de suas características por períodos de tempo mais longos (Rosenberg, 1998; Goulart & Callisto, 2003).

Neste sentido, autores Shultz e Liess (1999), por exemplo, em seus estudos verificaram uma redução no número de espécies em cinco datas pré e pós contaminação em três locais diferentes de um riacho de cabeceira contaminado por inseticidas, e portanto, evidenciando uma forte relação na diminuição das espécies e efeitos sobre essa comunidade de macroinvertebrados com o escoamento dos agrotóxicos aplicados na agricultura local. Redução na diversidade de macroinvertebrados em função da utilização de agrotóxicos também foram verificadas nos estudos de Beketov et al. (2013) realizados na Europa e na Austrália, os quais os autores concluíram que produtos utilizados nas culturas locais eram responsáveis por causar efeitos significativos na comunidade de macroinvertebrados presentes nas regiões do estudo. Corbi et al. (2013) por sua vez, verificaram desestabilização na comunidade de macroinvertebrados quando em contato com os agrotóxicos aplicados em plantações de banana de um córrego presente em uma área de preservação.

3.4. ÍNDICES ECOLÓGICOS

As comunidades biológicas tem sido fortemente influenciadas pelas atividades antrópicas, sendo necessário um maior entendimento dos processos e padrões para o sistema biológico, bem como o desenvolvimento de avaliações que possam garantir a proteção dos recursos biológicos (Karr, 1987). Entretanto, é um desafio para os estudos ambientais quantificar o grau de alterações no ambiente e consequências sobre os ecossistemas, bem como chegar em um diagnóstico da integridade dos ecossistemas (Brush Jr. et al., 2000). Neste sentido, o monitoramento da qualidade da água com base em métodos biológicos que utilizam de índices bióticos que expressem de forma numérica os efeitos da poluição por meio de um conjunto de dados sobre a composição da fauna em questão é uma ótima ferramenta e apresenta vantagens na geração de informações desses efeitos ambientais prolongados (Lobo et al., 2002).

Os índices bióticos, ou ecológicos são baseados em táxons bioindicadores específicos e se apresentam como uma técnica muito útil na avaliação dos efeitos das alterações ambientais (Castro, 2006). Nos ambientes aquáticos, espécies ou grupos de organismos macroinvertebrados, peixes, diatomáceas ou de outra comunidade podem ser utilizados como organismos bioindicadores (Washington, 1984). Os organismos bentônicos se destacam como organismos bases em estudos envolvendo índices ecológicos (Warwick, 1993, Niemi e Mc Donalds, 2004, Simboura et al., 2005, Quintino et al., 2006, Salas et al., 2006, Devlin et al., 2007, Borja et al., 2008, Dauvin et al., 2010). Por integrarem mudanças ao longo do tempo e condições ambientais (Salas et al., 2006), as comunidades bentônicas permitem o estudo das variações na diversidade de espécies e sua abundância relativa entre locais controle e perturbados com base em diversas análises multivariadas (Pearson e Rosenberg, 1978, Warwick e Clarke, 1993, Gray et al., 2002, Orfanidis et al., 2003, Ballesteros et al., 2007).

A diversidade de espécies é um índice que pode ser definido como uma função do número de espécies presentes, podendo trazer respostas sobre a riqueza ou abundância de espécies dos organismos avaliados (Margalef, 1958), sendo esse um importante indicador, pois a redução da riqueza ou abundância de uma determinada espécie pode ocasionar até uma extinção funcional de um ecossistema (Pranovi et al., 2000). Como uma ferramenta que busca identificar os fatores ambientais que propiciam a manutenção

das espécies em habita, a riqueza de espécies é uma ferramenta capaz de expressar a complexidade de um determinado local (Nabout et al., 2007). As gradezas abundância relativa e riqueza de espécies compreendem a distribuição das espécies permitindo compreender a diversidade e sua variação no espaço e no tempo (Duarte et al., 2006).

Por outro lado, a dominância de espécies traz respostas inversas sobre a diversidade de espécie e expõe as espécies mais dominantes amostradas (Souza et al., 2020). O índice de Shannon-Winner por sua vez, atribui um maior peso para as espécies raras (Shannon, 1948). Mais do que isso, o índice de diversidade de Shannon-Wiener não considera a riqueza de taxa e nem a abundância relativa dos organismos e analisa as espécies presentes, tendo sido este desenvolvido para resumir a composição de espécies nos diferentes períodos do ano e suas estações (Macedo, 1999; Cropper et al., 2001; Horne Engineering, 2003; Paula, 2004), enquanto que e o de Simpson é capaz de medir a probabilidade de dois indivíduos pertencerem a uma mesma espécie (Uramoto et al., 2005). De maneira geral, os índices utilizados nas avaliações de diversidade e riqueza devem ser interpretados com bastante cautela, uma vez que pode aumentar ou diminuir de maneira independente ao táxon existente na comunidade avaliada (Jaunatre et al., 2013).

3.5. ESTUDO EM MODELOS ECOSISTÊMICOS

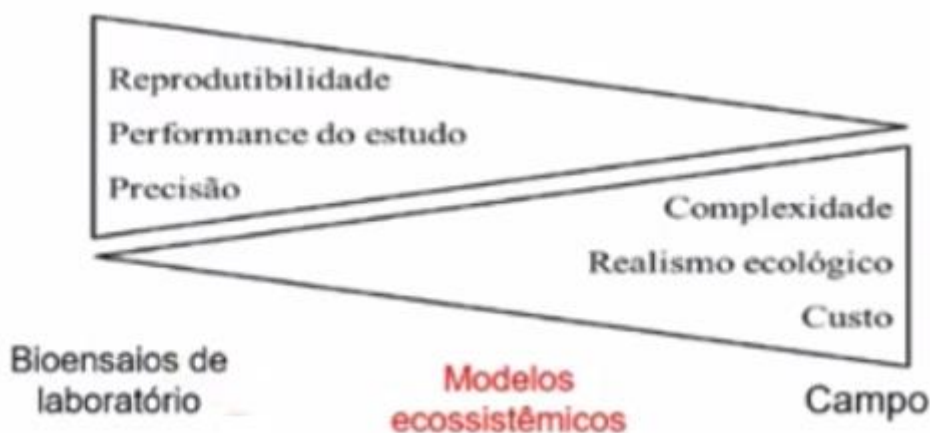
Buscando estudar os efeitos das contaminações as quais os ambientes aquáticos estão susceptíveis, muitos pesquisadores tem utilizado modelos ecossistêmicos para representar ao máximo a realidade natural do ecossistema a ser estudado. Os modelos ecossistêmicos ao ar livre, são instalações externas (Alexander et al., 2016) usados como ecossistemas artificiais que representam em escalas menores os ambientes naturais, os quais permitem avaliar alterações químicas, físicas e biológicas recorrentes de estressores ambientais (Odum, 1984; Kimball & Levin, 1985).

Os modelos ecossistêmicos podem ser classificados como micro ou mesocosmos, de modo que os microcosmos são sistemas experimentais contendo menos de 15 m³ ou riachos experimentais com menos de 15 m de comprimento, e os mesocosmos são sistemas experimentais contendo mais de 15 m³ ou riachos experimentais com mais de 15 m de comprimento (Crossland et al., 1992). Além disso, o termo “cosmos” também se referem a um espaço limitado em tamanho, tempo e massa de componentes abióticos e

bióticos, os quais apresentam contato restrito com o ambiente ao redor (Van Den Brink et al., 2005).

Os mesocosmos são considerados uma forma híbrida de técnica de campo e laboratório, como esquematizado na Figura 3, pois permitem reproduzir condições ambientais quase naturais sem deixar de ter o poder de controlar alguns parâmetros de interesse como habitats ou espécies, por exemplo, cuja finalidade se baseia em criar cenários realísticos de exposições quando comparado com testes laboratoriais (Alexander et al., 2016). Além disso, em comparação aos estudos de campo, os mesocosmos apresentam a vantagem da replicação, e embora logisticamente complexo, experimentos com mesocosmos tendem a produzir alta qualidade e possibilidade de reprodutibilidade dos dados apurados pela facilidade de coleta dos mesmos (Alexander et al., 2016).

Figura 3: Esquema representativo da comparação entre bioensaios de laboratório, modelos ecossistêmicos e experimentos de campo.



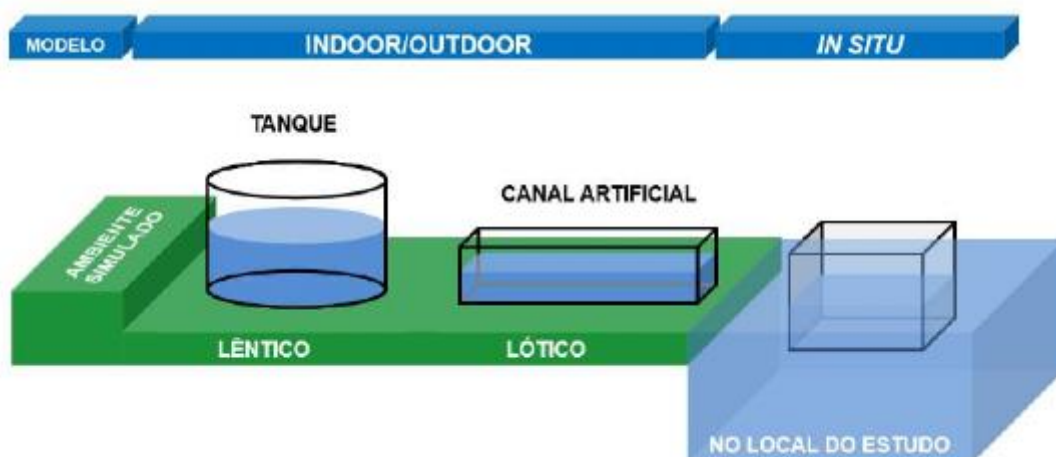
(Brock et al., 2000)

Através de experimentos em mesocosmos, é possível avaliar a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas a partir da composição e densidade das populações (Mendes, 2015), assim como também diminuem as incertezas associadas as extrapolações nas escalas ecossistêmicas, fornecendo informações sobre os efeitos indiretos dos contaminantes por meio da resposta da comunidade avaliada (Caquet et al., 2000). Além disso, por incorporarem maior complexidade os testes com mesocosmos podem gerar informações importantes sobre efeitos crônicos e subletais de poluentes em comunidades aquáticas (Alexander et al., 2016), além de contribuírem no biomonitoramento de avaliações de risco ecológico (Norton et al., 2014).

Em ensaios ecotoxicológicos, quanto mais espécies são avaliadas, melhor é a compreensão dos efeitos sobre a comunidade aquática e não apenas sobre uma determinada população (Costa et al., 2008), e por essa razão, dependendo do modelo de mesocosmos adotado, estudos com sistemas de mesocosmos apresentam também a vantagem de poder avaliar diferentes espécies de forma simultânea (Queiroz, 2019). Além disso, permitem inúmeras abordagens ecológicas de avaliação para poluentes, uma vez que, permite-se avaliar organismos modelos cultivados em laboratório que simula a condição do ambiente natural (Queiroz, 2019) como também utilizar e expor espécies nativas a um cenário de contaminação (Shangguan et al., 2017). Para os experimentos de mesocosmos *in situ*, ou seja, aqueles realizados no local de estudo, é possível avaliar os organismos presentes desse mesmo local de instalação (Queiroz et al., 2021), sendo geralmente utilizados comunidades de organismos planctônicos e bentônicos, os quais apresentam um grande número de indivíduos (Bashnin et al., 2019; Shannguan et al., 2017).

Diferentes modelos de mesocosmos tem sido proposto com a finalidade de simular os ambientes lóticos e lênticos (Queiroz et al., 2021). Para simulação dos ambientes lênticos, estudos *indoor* e *outdoor* que utilizam de tanques de diferentes volumes podem ser empregados, ao passo que na simulação de ambientes lóticos é necessário o emprego de canais artificiais com sistemas de bombeamento para representar a vazão de um rio, por exemplo (Figura 4) (Boone & James, 2005; Rowe & Dunson, 1994).

Figura 4: Modelos de ambientes simulados em de mesocosmos.



Fonte Queiroz e Silva (2021)

Nos ensaios de ambientes lênticos, os tanques são mais utilizados na avaliação ecotoxicológica de poluentes (Queiroz et al., 2021). Berghahn et al., (2012) avaliaram o efeito na comunidade de macroinvertebrados bentônicos do agrotóxico neonicotinóide imidacloprido utilizando modelo de mesocosmos lótico, no qual os organismos tiveram repetidas exposições ao composto por um período de tempo simulando as aplicações que ocorrem nas lavouras. Através desse ensaio, os autores foram capazes de observar efeitos de mortalidade, imobilidade e comportamental sobre os organismos. Em outro estudo semelhante, Böttger et al. (2013), embora os autores não tenham observado efeitos de mortalidade ou imobilidade nos organismos estudados, com o estudo foram capazes de identificar redução na taxa de reprodução dos mesmos. Através da abundância e diversidade de organismos zooplânctons, Lobson et al., (2018) conseguiu avaliar se o inseticida tiametoxam foram capazes de causar efeitos deletérios sobre os organismos. Neste estudo, os autores utilizaram um sistema de mesocosmos constituídos de tanques de polietileno com 4,13 m³ de volume.

Além disso, diferentes resultados podem ser obtidos nos testes ecotoxicológicos de mesocosmos quando comparados aos testes laboratoriais (Queiroz et al., 2021). Egea-Serrano & Tejeso (2014) avaliaram os efeitos de compostos nitrogenados sobre larvas de anfíbio *Pelophylax perezii* em sistemas de mesocosmos *outdoor* e observaram que houve redução na massa e crescimento das larvas desses organismos, resultados dos quais não foram observados nos ensaios utilizando mesocosmos *in situ*, por exemplo. Dessa forma, nota-se que os estudos em mesocosmos se apresentam como importante ferramenta na validação de resultados obtidos em escala laboratorial, além de melhorar a compreensão do real impacto de xenobióticos sobre os ecossistemas aquáticos (Queiroz & Silva, 2021).

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar os impactos dos agrotóxicos Regent[®] 800 WG (i.a. fipronil) e DMA[®] 806BR (i.a. 2,4-D) e da vinhaça, isoladamente e em misturas, sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos, por meio de estruturas de colonização, em modelos ecossistêmicos, considerando exposições a concentrações ambientalmente realistas desses compostos.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a composição da comunidade de macroinvertebrados bentônicos dos mesocosmos impactados com diferentes tratamentos de agrotóxicos e vinhaça, de forma isolada e em mistura;
- Avaliar os efeitos na estrutura da comunidade de macroinvertebrados, através da abundância de espécies, bem como sua capacidade de reestabelecimento frente à contaminação ambiental pelos compostos;
- Através dos índices ecológicos, compreender as características da comunidade de macroinvertebrados bentônicos pré e pós exposição aos agrotóxicos e vinhaça.
- Avaliar os efeitos dos agrotóxicos e vinhaça, de forma isolada e em mistura, sobre a diversidade funcional de macroinvertebrados bentônicos;

5. HIPÓTESES

Com base no contexto apresentado e no estado da arte, foram elencadas as seguintes hipóteses:

Hipótese 1: O inseticida fipronil exerce efeitos mais severos na estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos do que o herbicida 2,4-D e a vinhaça, uma vez que, estudos anteriores apontam neurotoxicidade em insetos causada pela presença de fipronil.

Hipótese 2: A vinhaça isoladamente, na concentração estudada, é suficientemente capaz de apresentar modificações nos compartimentos ambientais por toxicidade de metais, excesso de matéria orgânica, alta composição iônica e alterações nas características físicas e químicas da água, refletindo em efeitos sobre a comunidade de macroinvertebrados, conforme apontado em outros estudos.

Hipótese 3: A mistura dos agrotóxicos Regent[®] 800 WG e DMA[®] 806 BR tem sua toxicidade e efeitos deletérios a comunidade de macroinvertebrados potencializados, caracterizando um efeito sinérgico.

Hipótese 4: A ocorrência simultânea dos agrotóxicos Regent[®] 800 WG e DMA[®] 806 BR com a vinhaça da cana-de-açúcar no ambiente aquático, gera efeitos mais severos e deletérios na comunidade de macroinvertebrados bentônicos, bem como, maiores alterações nas características físico-químicas do ambiente aquático do que quando estes compostos estão isolados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, A.C. et al. Mesocosm and Field Toxicity Testing in the Marine Context. **Marine Ecotoxicology**, [S.L.], p. 239-256, 2016.

AMÉRICO, J. H. P. et al. o uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos. **Revista Científica ANAP Brasil**, v. 8, n. 13, 15 nov. 2015.

ARCAUTE, C. et al. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 128, p. 222-229, jun. 2016.

BALLESTEROS, E. et al. A new methodology based on littoral community cartography dominated by macroalgae for the implementation of the European Water Framework Directive. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 55, n. 1-6, p. 172-180, jan. 2007.

BARATA, C. et al. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 1, p. 1–14, 2006.

BASHNIN, T. et al. Relationship between pesticide accumulation in transplanted zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and community structure of aquatic macroinvertebrates. **Environmental Pollution**. 252, 591–598, 2019.

BEKETOV, M. A. et al. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 11039-11043, 2013.

BERGHAHN, R. et al. Effects of repeated insecticide pulses on macroinvertebrate drift in indoor stream mesocosms. **Aquatic Toxicology**. 122–123, 56–66, 2012.

BIOJURC, 2014. **Macroinvertebrados bentônicos de água doce**. Disponível em: <https://biourjc.files.wordpress.com/2014/09/bentos.jpg>. Acesso em: 12 nov. 2022.

BISPO, P. C., OLIVEIRA, L. G. Diversity and structure of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera (Insecta) assemblages from riffles in mountain streams of Central Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 24: 283–293, 2007.

BOONE, M., JAMES, S. Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. **Appl. Herpetol.** 2, 231–257, 2005.

BORJA, A. et al. Classifying Ecological Quality and Integrity of Estuaries. **Treatise On Estuarine And Coastal Science**, [S.L.], p. 125-162, 2011.

BORTOLOZO, F. R. et al. Peatland as a natural sink for pesticides from no-till systems in subtropical climate. **Agricultural Water Management**, v. 163, n. Supplement C, p. 19–27, 1 jan. 2016.

BOTELHO, R. G. et al. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, 94:10, 2035-2045, 2012.

BOTELHO, R. G. Avaliação da qualidade da água do Rio Piracicaba (SP) e efeito da vinhaça para organismos aquáticos antes e após o pH. 110 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Agrônômica, Centro de Energia Nuclear e Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BÖTTGER, R. et al. Effects of low-dosed imidacloprid pulses on the functional role of the caged amphipod *Gammarus roeseli* in stream mesocosms. **Ecotoxicology Environmental**. Saf. 93, 93–100, 2013.

BRENNAN, A. A. et al. Degradation of fipronil in anaerobic sediments and the effect on porewater concentrations. **Chemosphere**, v. 77, n. 1, p. 22–28, 2009.

BROCK, R. P. A. et al. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems; Part 2: insecticides. van Wijngaarden & G.J. van Gees, 2000.

BRUSCHI Jr., W. et al. Avaliação da Qualidade Ambiental dos riachos através das Taxocenoses de peixes. In Carvão e Meio Ambiente (Centro de Ecologia/UFRGS.). Ed. UFRGS, Porto Alegre, 1856p, 2000.

CALDARELLI, C. E.; GILIO, L. Expansion of the sugarcane industry and its effects on land use in São Paulo: Analysis from 2000 through 2015. *Land use policy* 76:264–274, 2018.

CALLISTO, M.; ESTEVES, F. A. Distribuição da comunidade de macroinvertebrados bentônicos em um ecossistema amazônico impactado por rejeito de bauxita – Lago Batata (Pará, Brasil). **Oecologia Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 335-348, 1995.

CAQUET, T. et al. Mesocosms in ecotoxicology (1): Outdoor aquatic systems. In: **Reviews of environmental contamination and toxicology**. Springer, New York, NY, 2000.

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v.6, n. 2, p. 48–60, 2017.

CASTRO, S. V. de. Efeitos de metais pesados presentes na água sobre a estrutura das comunidades bentônicas do alto rio das velhas-mg. 2006. 1 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2018. Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo 2017. Relatórios. Série Relatórios/CETESB, São Paulo, 2018.

CETESB. Proposta para derivação de critérios para contaminantes ambientais da agricultura. **Relatório Técnico** - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2010.

CHANDRA, R. et al. Bacterial pretreatment enhances removal of heavy metals during treatment of post-methanated distillery effluent by *Typha angustata* L. J. **Environmental Management**, 2008.

CHATTERJEE, N. S.; GUPTA, S. Fipronil Mobility and Transformation in Undisturbed Soil Columns. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, n. 2, p. 152–156, 2010.

- CORAZZA, R. I. et al. Impactos Ambientais da Vinhaça: Controvérsias Científicas e Lock-In na Fertirrigação. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural “Questões Agrárias, Educação no Campo e Desenvolvimento”, 44., 2006, Fortaleza, jul. 2006. Anais. Brasília: SOBER, 2006.
- CORBI, J. J. et al. Are aquatic insect species sensitive to banana plant cultivation? **Ecological Indicators**. 25: 156-161, 2013.
- CORREIA, J. E. et al. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 319–326, 2017.
- COSTA, R. C. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova* 31, 1820–1830, 2008.
- COVICH, A. P. et al. The role of benthic invertebrate species in freshwater ecosystems: Zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. *BioScience*, 49(2): 119-127, 1999.
- CROPPER, W.P. et al. Population dynamics of a commercial sponge in Biscayne Bay, Florida. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 53, 13-23. 2001.
- CROSSLAND, N. O.; LA POINT, T. W. The design of mesocosm experiments. **Environmental, Toxicology and Chemistry**, 11: 1-4, 1992.
- CUMMINS, K. W. et al. Shredders and riparian vegetation. Leaf litter that falls into streams influences communities of stream invertebrates. **Bioscience**, v. 39, n. 1, p. 24-30, 1989.
- CUMMINS, K. W. Structure and function of stream ecosystems. **Bioscience**, 24, pp. 631-641, 1974.
- CUMMINS, K. W. Trophic relations of aquatic insects. **Annual Review of Entomology**, 18, pp. 183-206, 1973.
- CUMMINS, K. W., WILZBACH, M. A. **Field Procedures for the Analysis of Functional Feeding Groups in Stream Ecosystems. Appalachian Environmental Laboratory, Contribution No. 1611** University of Maryland, Frostburg, MD, USA, 1985.
- CUMMINS, K. W.; KLUG, M. J. Feeding ecology on stream invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematic*, v. 10, p. 147-172, 1979.
- DAUVIN, J. et al. The ecological quality status of the Bay of Seine and the Seine estuary: use of biotic indices. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 55, n. 1-6, p. 241-257, jan. 2007.
- DEVAI, G. Ecological background and importance of the change of chironomid fauna in shallow Lake Balaton. *Hidrobiologia*, 191: 189-198, 1990.

- DEVLIN, M. et al. Establishing boundary classes for the classification of UK marine waters using phytoplankton communities. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 55, n. 1-6, p. 91-103, jan. 2007.
- DI VEROLI, A. et al. Sediment toxicity and deformities of chironomid larvae in Lake Piediluco (Central Italy). **Chemosphere** 79 (1): 33-39, 2010.
- DIAZ, R. J., ROSENBERG, R. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology*, 33: 245–303, 1995.
- DUAN, X. et al. Effects of fluvial processes and human activities on stream macroinvertebrates. **International Journal of Sediment Research**, v. 26, n. 4, p. 416–430, 2011.
- DUARTE, P. et al. The relationship between phytoplankton diversity and community function in a coastal lagoon. *Hydrobiologia*, v. 555, p. 3–18, 2006.
- EGEA-SERRANO, A., TEJEDO, M. Contrasting effects of nitrogenous pollution on fitness and swimming performance of Iberian waterfrog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), larvae in mesocosms and field enclosures. **Aquatic Toxicology**. 146, 144–153, 2014.
- ESPANA-GAMBOA, E. et al. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management Research**. 29(12), 1235–1250, 2011.
- EZCURRA de DRAGO, I. et al. Benthic Invertebrates. In: IRIONDO, M. H., PAGGI, J. C. & PARMA, M. J. (Eds.) *The Middle Paraná River: Limnology of a Subtropical Wetland*. Berlin: Springer-Verlag, 2007.
- FANG, W. et al. A critical review of synthetic chemicals in the surface Waters of the USA, EU and China. **Environmental**. Int. 131, 104994, 2019.
- FAO. In: B´elanger, J., Pilling, D. (Eds.), *The State of the World’s Biodiversity for Food and Agriculture*. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments, Rome, p. 572, 2019.
- FREITAS, J. S. et al. Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.L.], v. 182, p. 109-446, out. 2019.
- FUESS, L. T. et al. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization, **Journal of Environmental Science and Health**, Part A, 52:11, 1063-1072, 2017.
- FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Bioenergy from stillage anaerobic digestion to enhance the energy balance ratio of ethanol production. *J. Environmental Management*, 162, 102–114, 2015.
- FUESS, L. T.; GARGIA, M. L. Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. *J. Environmental Management*, 145, 210–229, 2014.

GALDEAN, N. et al. Lotic Ecosystems of Serra do Cipó, southeast Brazil: water quality and a tentative classification based on the benthic macroinvertebrate community. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, 3: 545-552, 2000.

GARCIA, C. F. H. et al. Toxicity of two effluents from agricultural activity: Comparing the genotoxicity of sugar cane and orange vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 216–221, 2017.

GONÇALVES, F. B.; ARANHA, J. M. R. Ocupação espaço-temporal pelos macroinvertebrados bentônicos na bacia do rio Ribeirão, Paranaguá, PR (Brasil) *Acta Biol. Par.*, Curitiba, 33 (1, 2, 3, 4), p.181-191, 2004.

GOULART, M., CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, no 1, 2003.

GRAY, Js; WU, Rs; OR, Yy. Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. **Marine Ecology Progress Series**, [S.L.], v. 238, p. 249-279, 2002.

GUERREIRO, L. F. et al. Treatment of sugarcane vinasse by combination of coagulation/flocculation and Fenton's oxidation. **J. Environmental Management**. 181, 237–248, 2016.

GUNKEL, G. et al. Sugar Cane Industry as a Source of Water Pollution – Case Study on the Situation in Ipojuca River, Pernambuco, Brazil. **Water Air Soil Pollution**, 180: 261- 269, 2007.

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

HAUER, F. R.; RESH, V. H. Macroinvertebrates. Pages 435-454 In: Hauer, F.R. and GA. Lamberti (eds.). **Methods in stream ecology**, 2nd edition. Academic Press, Burlington, Massachusetts, 2006.

HAUER, F.R., V.H. RESH. Benthic macroinvertebrates, p. 339-369. *In*: F.R. HAUER & G.A. LAMBERTI (Eds). **Stream ecology**. San Diego, Academic Press, 674p, 1996.

HERBRANDSON, C. et al. 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.

HORNE ENGINEERING - Benthic survey report - Anacostia River - Washington, DC. Fairfax, VA 22031 – September, 2003.

HYNES, H. B. *The Ecology of Running Waters*. Ontario: The blackburn press. 2001.

HYNES, H. B. *The Ecology of Running Waters*. Toronto: University of Toronto Press, 1970.

- ILMONEN, J. et al. Responses of spring macroinvertebrate and bryophyte communities to habitat modification: community composition, species richness, and red-listed species. **Freshwater Science**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 657-667, jun. 2012.
- ISLAMA, M. A. et al. Potential impact of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide on humans e ecosystems. **Environmental. Int.** 111, 332 e 351, 2018.
- JAUNATRE, R. et al. New synthetic indicators to assess community resilience and restoration success. **Ecological Indicators**, [S.L.], v. 29, p. 468-477, jun. 2013
- KARR, J. R. Biological monitoring and environmental assessment: a conceptual framework. **Environmental Management**. 11:249-256, 1987.
- KIMBALL, K. D.; LEVIN, S. A. et al. Limitations of laboratory bioassays: the need for ecosystem-level testing. **BioScience** 35:165-171, 1985.
- KLEINE, P., TRIVINHO-STRIXINO, S. 2005. Chironomidae and other aquatic macroinvertebrates of a first order stream: community response after habitat fragmentation. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 17: 81-90.
- KORNDORFER, G. H.; ANDERSON, D. L. Use and impact of sugar-alcohol residues vinasse and filter cake on sugarcane production in Brazil. **Sugar y Azucar**, 92(3), 26–35, 1997.
- LAKE, P. S. Disturbing hard and soft bottom communities: a comparison of marine and freshwater environments. *Australian Journal of Ecology*, 15: 477-488, 1990.
- LIGEIRO, R. et al. Defining quantitative stream disturbance gradients and the additive role of habitat variation to explain macroinvertebrate taxa richness. **Ecological Indicators**, v. 25, p. 45-57, 2013.
- LOBO, E.A., CALLEGARO, V.L.M. & BENDER, E.P. Utilização de algas diatomáceas epilíticas como indicadores da qualidade da água em rios e arroios da região hidrográfica do Guaíba, RS, Brasil. EDUNISC, Santa Cruz do Sul, 127p, 2002.
- LOBSON, C. et al. Fate of thiamethoxam in mesocosms and response of the zooplankton community. **Science Total Environmental**. 637–638, 1150–1157, 2018.
- LOPES, M.A.; CONTINI, E. Agricultura, Sustentabilidade e Tecnologia. **Agroanalysis**. Especial EMBRAPA. 2012.
- MACEDO, F.W. Medidas de Diversidade Biológica. UTAD, Lisboa, 1999.
- MANDAL, K.; SINGH, B. Dissipation of fipronil granule formulation in sugarcane field soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 142–147, 2013.
- MANDAVILLE, S.M. Bioassessment of Freshwaters Using Benthic Macroinvertebrates- A Primer. First Ed. Project E-1, Soil & Water Conservation Society of Metro Halifax. viii, Chapters I-XXVII, Appendices A-D. 244p.1999.

MANGADZE, T. et al. Choice of biota in stream assessment and monitoring programs in tropical streams: A comparison of diatoms, macroinvertebrates and fish. **Ecological Indicators**, v. 63, p. 128–143, 2016.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2017. Brasil: Projeções do agronegócio 2016/2017 a 2026/2027. Brasília: MAPA.

MARGALEF, R. Information theory in ecology. **Gen. System**. 3:36-71, 1958.

MARINHO, J. F. U. et al. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239–245, 2014.

MARZIN, A. et al. Ecological assessment of running waters: do macrophytes, macroinvertebrates, diatoms and fish show similar responses to human pressures? **Ecological Indicators**, v. 23, p. 56–65, 2012.

MATTSON, R. A. et al. **Hydroecological monitoring of benthic invertebrate communities of marsh habitat in the upper and middle St. Johns River**. Florida Scientist, 77, pp. 144-161, 2014.

MENDES, L. B. O uso de modelos ecossistêmicos e experimentos laboratoriais para avaliação dos efeitos do agrotóxico Mythos® (i.e. pyrimethanil) em ecossistemas aquáticos. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 1 dez. 2015.

MERRITT, R. W. et al. The Kissimmee River-riparian marsh ecosystem, Florida: seasonal differences in invertebrate functional feeding group relationships D. Batzer, R.B. Rader, S. A Wissinger (Eds.), **Invertebrates in Freshwater Wetlands of North America**, Wiley and Sons, NY, pp. 55-79, 1999.

MERRITT, R. W. et al. **The role of aquatic insects in the processing and cycling of nutrientes**. V.H. Resh, D.M. Rosenberg (Eds.), **The Ecology of Aquatic Insects**, Praeger Scientific, New York, NY, USA, pp. 134-163, 1984.

MERRITT, R. W. et al. Trophic Relationships of Macroinvertebrates. **Methods In Stream Ecology, Volume 1**, [S.L.], p. 413-433, 2017.

MERRITT, R. W. et al. Berg (Eds.), An Introduction to the Aquatic Insects of North America (fourth ed.), Kendall/Hunt, Dubuque, IA, USA, 2008.

MERRITT, R. W.; CUMMINS, K. W. An introduction to the aquatic insects of North America. 3. ed. Dubuque: Kendall/Hunt, 1996.

MERRITT, R. W. et al. Development and application of a macroinvertebrate functional-group approach in the bioassessment of remnant river oxbows in southwest Florida. **Journal of the North American Benthological Society**, 21, pp. 290-310, 2002.

MORAIS, G. dos S. et al. Efeitos biológicos, bioquímicos e genotóxicos do Sb no mosquito *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 176, 196–203, 2019.

- MORAN-SALAZAR, R. G. et al. Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. **Springerplus**, 5(1):1007, 2016.
- MOREIRA, R. A. Efeitos dos Agrotóxicos Kraft 36 EC (abamectina) e Score 250 EC (difenoconazol), Isolados e em Misturas, sobre Organismos Zooplanctônicos. 2017. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.
- MOREIRA, R. A. et al. Exposure to environmental concentrations of fipronil and 2,4-D mixtures causes physiological, morphological and biochemical changes in *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 206, p. 111-180, dez. 2020b.
- MOREIRA, R. A. et al. 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**, [S.L.], v. 79, n. 3, p. 298-309, 28 ago. 2020a.
- NABOUT, J. C. et al. Phytoplankton diversity (alpha, beta and gamma) from the Araguaia River tropical floodplain lakes (central Brazil). **Hydrobiologia**, v. 575, p. 455-461, 2007.
- NANDAN, R. et al. Biomethanation of spent wash: Heavy metal inhibition of methanogenesis in synthetic medium. **J. Ferment. Bioeng.** 69(5), 276–282, 1990.
- NIEMI, G. J., MC DONALDS, M. E. Application of ecological indicators. **Annual Review of Ecology, Evolution and System**, 35, pp. 89-111, 2004.
- NORTON, S. B., CORMIER, S. M., SUTER, G. W. Ecological Causal Assessment. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2014
- OCDE-FAO - Organização para a cooperação e o desenvolvimento econômico—organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura. 2015. **Agricultural Outlook 2015**. Paris: OECD Publishing.
- ODUM, E. P. Ecologia. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 434 p., 1984.
- ODUM, E. P. The Mesocosm. **BioScience**, 34: 558-562, 1984.
- ORFANIDIS, S; PANAYOTIDIS, P; STAMATIS, N. An insight to the ecological evaluation index (EEI). **Ecological Indicators**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 27-33, abr. 2003.
- ÖZKUL, M. et al. Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2395–2405, dez. 2016.
- PADISÁK, J. et al. Phytoplankton composition, biodiversity and a pilot survey of toxic cyanoprokaryotes in a large cascading reservoir system (Tietê basin, Brazil). **Sil Proceedings, 1922-2010**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 2734-2742, dez. 2000.
- PAULA, P.M.S. Diagnóstico do Monitoramento Biológico Trecho Alto Rio Das Velhas (MG). Plano Diretor de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio das Velhas. IGAM. Belo Horizonte, Set. 2004.

PEARSON, T.H., ROSENBERG, R. Macrobenthic Succession in Relation to Organic Enrichment and Pollution of the Marine Environment. **Oceanography and Marine Biology**—An Annual Review, 16, 229-311, 1978.

PHYU, Y. L. et al. 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.

PIGNATA, C. et al. Application of European biomonitoring techniques in China: Are they a useful tool? **Ecological Indicators**, v. 29, p. 489–500, jun. 2013.

PINILLA, G. An index of limnological conditions for urban wetlands of Bogotá city, Colombia. **Ecological Indicators**, v. 10, n. 4, p. 848–856, 2010.

PINTO, T. J. da S. et al. Functional responses of *Hyalella meinerti* after exposure to environmentally realistic concentrations of 2,4-D, fipronil and vinasse (individually and in mixture). **Ecotoxicologia Aquática**, São Carlos, p. 1-44, abr. 2020.

PINTO, T. J. da S. Impactos do inseticida fipronil e do herbicida 2,4D (isolados e em misturas) sobre macroinvertebrados aquáticos bentônicos neotropicais. 2018. 144 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

PRANOVI, F. Rapido trawling in the northern Adriatic Sea: effects on benthic communities in an experimental area. **Ices Journal Of Marine Science**, [S.L.], v. 57, n. 3, p. 517-524, jun. 2000.

QUEIROZ, L. G. Efeitos tóxicos do inseticida neonicotinóide imidacloprido em organismos aquáticos não-alvo. Universidade de São Paulo, 2019.

QUEIROZ, L. G. et al. Mesocosmos como modelo experimental na avaliação da ecotoxicidade aquática. **Recurso Água - Tecnologias e Pesquisas Para O Uso e A Conservação de Ecossistemas Aquáticos**, [S.L.], p. 35-59, 2021.

QUINTINO, Victor; ELLIOTT, Michael; RODRIGUES, Ana Maria. The derivation, performance and role of univariate and multivariate indicators of benthic change: case studies at differing spatial scales. **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, [S.L.], v. 330, n. 1, p. 368-382, mar. 2006.

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

RESH, V. H.; ROSENBERG, D.M. Spatial-temporal variability and the study of aquatic insects. **The Canadian Entomologist**, v. 121, n. 11, p. 941-963, 1989.

REYNOLD, C. S., ELLIOT, J. A. Complexity and emergent properties in aquatic ecosystems: predictability of ecosystem responses. **Freshwater Biology**, 57 (1), 74–90, 2012.

RODRIGUES, R. et al. Agro é paz: análises e propostas para o Brasil alimentar o mundo. Piracicaba: Dibd/esalq/usp, 2018. 420 p. DOI: 10.11606/9788586481666.

- ROSENBERG, D.M. A National Aquatic Ecosystem Health Program for Canada: We should go against the flow. *Bull. Entomol. Soc. Can.* 30(4):144-152.1998.
- ROWE, C. L., DUNSON, W. A. The Value of Simulated Pond Communities in Mesocosms for Studies of Amphibian Ecology and Ecotoxicology. *J. Herpetol.* 28, 346–356, 1994.
- RUANGSOMBOOM, S.; WONGRAT, L. Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*. *Aquatic Toxicology*, 78: 15-20, 2006.
- SALAS, F.; MARCOS, C.; J.M. NETO,; PATRÍCIO, J.; PÉREZ-RUZAFÁ, A.; MARQUES, J.C.. User-friendly guide for using benthic ecological indicators in coastal and marine quality assessment. *Ocean & Coastal Management*, [S.L.], v. 49, n. 5-6, p. 308-331, jan. 2006.
- SCHRÖDER, M. et al. Substratum associations of benthic invertebrates in lowland and mountain streams. *Ecological Indicators*, v. 30, p. 178–189, 2013.
- SCHULZ, R.; LIESS, M. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquatic Toxicology*, v. 46, n. 3, p. 155-176, 1999.
- SHANGGUAN, Y. et al. Phytoplankton assemblage response to changing nutrients in Florida Bay: Results of mesocosm studies. *J. Exp. Mar. Biology and Ecology*. 494, 38–53, 2017.
- SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. *Bulletin of System Tecnology Journal*, v. 27, p. 379-423, 1948.
- SHARMA, K. K.; CHOWDHARY, S. Macroinvertebrate assemblages as biological indicators of pollution in a Central Himalayan River, Tawi (J&K). *ResearchGate*, v. 3, n. 5, p. 167–174, 1 abr. 2011.
- SILVA, A. R. R. et al. 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, F.H. et al. Índices bióticos para avaliação da qualidade ambiental em trechos do rio Correntoso, Pantanal do Negro, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 33(3):289-299, 2011.
- SILVA, L. C. M. et al. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicology*, 2020.
- SILVEIRA, M. P. et al. Protocolo de coleta e preparação de amostras de macroinvertebrados bentônicos em riachos. Comunicado técnico. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2004.

SIMBOURA, N.; ARGYROU, M. An insight into the performance of benthic classification indices tested in Eastern Mediterranean coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 60, n. 5, p. 701-709, maio 2010.

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

SMITH, V. H. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science and Pollution Research*, 10: 126–139, 2003.

SOUSA, E. B. de et al. Composição, riqueza e índices ecológicos do fitoplâncton do lago Bolonha (Belém, Pará) / Composition, richness and ecological index of phytoplankton of lake Bolonha (Belém, Pará). **Brazilian Journal Of Animal And Environmental Research**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 3263-3275, 2020.

SOUZA, T. et al. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental and Monitoring Assessment**. 185, 2013.

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.

TCHBANOGLOUS, G. et al. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, 4th ed.; **McGraw-Hill Inc.**: New York, 2003.

TOMANOVA, S. et al. Trophic Levels and Functional Feeding Groups of Macroinvertebrates in Neotropical Streams. **Hydrobiologia**, [S.L.], v. 556, n. 1, p. 251-264, fev. 2006.

TOMLIN, C. The Pesticide Manual. 10. ed. Cambridge: **The royal society of chemistry**, 1994.

ULRICH, U. et al. Herbicide transport via surface runoff during intermitente artificial rainfall: A laboratory plot scale study. **Catena**, v. 101, n. Supplement C, p. 38–49, 1 fev. 2013.

URAMOTO, K. et al. Análise Quantitativa e Distribuição de Populações de Espécies de Anastrepha (Diptera: Tephritidae) no Campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. *Neotropical Entomology*, v.34, n. 1, p. 033-039, 2005.

VAN DE MEUTTER, F., et al. The effect of turbidity state and microhabitat on macroinvertebrate assemblages: a pilot study of six shallow lakes. *Hydrobiologia*, 542: 379–390, 2005.

VAN DEN BRINK, P. J. et al. The use of terrestrial and aquatic microcosms and mesocosms for the ecological risk assessment of veterinary medicinal products. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 24: 820-829, 2005.

VANNOTE, R. L. et al. The River Continuum Concept. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 37, n. 1, p. 130–137, 1980.

- WALLACE, J. B., MERRITT, R. W. Filter-feeding ecology of aquatic insects. **Annual Review of Entomology**, 25, pp. 103-132, 1980.
- WARD, D. et al. The New Rivers & Wildlife Handbook. Bedfordshire: RSPP, NRA e The Wildlife Trusts, 1995.
- WARWICK, R. M., CLARKE, K. R. Comparing the severity of disturbance: a metaanalysis of marine macrobenthic community data - **Marine ecology progress series**, 1993.
- WARWICK, R. M. Environmental impact studies on marine communities: pragmatical considerations. **Australian Journal of Ecology**, 1993.
- WASHINGTON, H.G. Diversity, Biotic and Similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Research**. 18(6):653-694, 1984.
- WESTON, D. P.; LYDY, M. J. Toxicity of the Insecticide Fipronil and Its Degradates to Benthic Macroinvertebrates of Urban Streams. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 2, p. 1290–1297, 2014.
- WHO. Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater; **Volume II: Wastewater Use in Agriculture**. Geneva, Switzerland: WHO, 2006, 196.
- WILKIE, A. C. et al. Stillage treated characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feed stocks. **Biomass and Bioenergy** 19: 63–102, 2000.
- WILLIS, G. H.; MCDOWELL, L. L. Pesticides in agricultural *runoff* and their effects on downstream water quality. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 267-279, 1982.
- WU, H. et al. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 9–14, 2014.

CAPÍTULO 2: EXPOSIÇÃO REALISTA AO FIPRONIL, 2,4-D E VINHAÇA INFLUENCIA A ESTRUTURA TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA ASSEMBLEIA DE MACROINVERTEBRADOS

1. INTRODUÇÃO

Grandes quantidades de contaminantes atingem ecossistemas aquáticos por diferentes fontes antrópicas (Quadra et al., 2019), tornando a poluição da água um dos principais problemas ambientais no mundo (Brovini et al., 2021). Os ambientes aquáticos contaminados por agrotóxicos, por exemplo, têm impactado negativamente, devido a ação tóxica desses compostos, diversos organismos não alvos em seus diferentes níveis tróficos, como peixes (Sanches et al., 2017), anfíbios (Freitas et al., 2019), macroinvertebrados bentônicos, (Pinto et al., 2021a; Pinto et al., 2021b), cladóceros (Moreira et al., 2017; Silva et al., 2020a) e algas (Mansano et al., 2017). Portanto, a biodiversidade aquática é colocada em risco devido as extensas atividades agrícolas praticadas em seu entorno, com destaque ao uso de agrotóxicos e fertilizantes que chegam às águas superficiais advindo de diferentes processos de transporte, como a lixiviação, escoamento superficial, volatilização, deriva e outros (Stehle; Schulz, 2015).

No Brasil, a cana-de-açúcar é uma das principais culturas para a economia nacional (Sanches et al., 2017), na qual o 2,4-D, herbicida sistêmico que atua como inibidor do crescimento de plantas dicotiledôneas (Islam et al., 2018), e o fipronil, inseticida do grupo dos fenilpirazóis que atua como inibidor dos canais de regulação de íons cloro através de receptores do ácido gama aminobutírico (GABA) em insetos (Jennings et al., 2002), se destacam como um dos principais ingredientes ativos utilizados nessas culturas no país (Christofoletti et al., 2017; CONAB, 2017; IBAMA et al., 2019). Além disso, a indústria sucroalcooleira produz uma grande quantidade de vinhaça, um subproduto da produção do etanol gerado numa taxa de 14L de vinhaça por litro de etanol obtido (Espanha-Ganboa et al., 2012). Esse resíduo apresenta um alto potencial poluidor (Ortegón et al., 2016), sendo seu descarte *in natura* proibido em corpos d'água desde o final da década de 1970 (Brasil, 1978). Como alternativa, as práticas de manejo de cana-de-açúcar têm incorporado esse resíduo nas lavouras (Ferreira et al., 2011), uma vez que esse é uma fonte alternativa de macro e micronutrientes para substituir os fertilizantes sintéticos de alto custo (Dotaniya et al., 2016). No entanto, seu uso demasiado pode causar sérios impactos ambientais, pois a vinhaça apresenta alta concentração de matéria

orgânica e teor de metais, que podem promover a proliferação de microrganismos e diminuição de oxigênio dissolvido na água (Botelho, 2013).

A presença desses compostos, pesticidas e vinhaça, nos ambientes naturais pode ocorrer simultaneamente (Herbrandson et al., 2003), e dessa forma podem causar diferentes efeitos nos organismos autóctones do que quando os compostos ocorrem de forma isolada. De acordo com o estudo de Pinto et al. (2021), a presença de 2,4-D, fipronil e vinhaça isoladamente e em mistura, em concentrações ambientalmente realistas derivados do manejo de cana-de-açúcar, impactou negativamente as respostas funcionais da espécie *Hyaella meinerti*, um anfípode de hábitos epibentônicos. Para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, em experimentos de mesocosmos, a espécie foi altamente sensível à alta toxicidade do inseticida fipronil, da vinhaça e de suas misturas, sendo a sobrevivência amplamente afetada (Silva et al., 2021). Em ambos os estudos, a aplicação simultânea dos agrotóxicos e vinhaça apresentou efeitos tóxicos mais severos e prolongados. Estudos anteriores de laboratório também demonstraram efeitos (antagônicos ou sinérgicos) do fipronil e 2,4-D quando agiam simultaneamente sobre diferentes organismos da biota aquática, como a microalga *Raphidocelis subcapitata* (Moreira et al., 2020^a), o inseto *Chironomus sancticaroli* (Pinto et al., 2021), os peixes das espécies *Prochilodus lineatus* (Portruneli et al., 2021) e *Danio rerio* (Viana et al., 2022) e girinos das espécies *Leptodactylus fuscus* e *Lithobates catesbeianus* (Freitas et al., 2022).

Dentre a biota aquática, os macroinvertebrados bentônicos são importantes bioindicadores de qualidade da água. Estes organismos ligam a matéria orgânica e recursos nutricionais dos níveis menores com os mais elevados da cadeia trófica (Nkwoji et al., 2016). Além disso, podem apresentar característica de tolerância ou elevada sensibilidade à poluição, podendo fornecer informações importantes para a compreensão dos efeitos cumulativos de alguns xenobióticos presentes no ambiente (Herman e Nejadhashemi, 2015). Por essa razão, macroinvertebrados bentônicos têm sido considerados um grupo taxonômico importante e eficaz para a avaliação da toxicidade de diversos contaminantes, principalmente porque estão expostos a produtos químicos por meio da água e sedimento contaminados (Morais et al., 2019).

Diante do apresentado, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar os impactos dos agrotóxicos Regent[®] 800 WG (i.a. fipronil) e DMA[®]806 BR (i.a. 2,4-D) e da vinhaça de cana-de-açúcar, isoladamente e em misturas, sobre a comunidade de

macroinvertebrados bentônicos, por meio de estruturas de colonização, em mesocosmos ao ar livre, considerando exposições a concentrações ambientalmente realistas desses compostos por 1, 7, 14, 28, 75 e 150 dias. Assim sendo, considerando o objetivo proposto, foram analisadas: *i*) a composição e índices ecológicos de abundância relativa, riqueza, dominância e diversidade da comunidade de macroinvertebrados bentônicos dos mesocosmos impactados com diferentes tratamentos de agrotóxicos e vinhaça, de forma isolada e em mistura; *ii*) os efeitos na estrutura da comunidade de macroinvertebrados, através da abundância de famílias, bem como sua capacidade de reestabelecimento frente à contaminação ambiental pelos compostos; *iii*) os efeitos dos agrotóxicos e vinhaça, de forma isolada e em mistura, sobre a diversidade funcional alimentar dos macroinvertebrados bentônicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. DESENHO EXPERIMENTAL

Os estudos em mesocosmos foram realizados no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA) no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA) (22 ° 01'22 " S, 43 ° 57'38 " W) da Universidade de São Paulo (USP). Os mesocosmos foram montados em tanques de polipropileno atóxico com volume de 1500 L, profundidade de 0,83 m e diâmetro de topo de 1,75 m. Para evitar o superaquecimento, cada mesocosmo foi enterrado 0,6 m abaixo do nível do solo. Em cada tanque foi adicionada uma camada de 20 cm de solo natural retirado do próprio local (propriedades descritas em Figueiredo et al., 2020) como sedimento, e preenchido com água de poço profundo (60 cm de coluna d'água). Para a inoculação da fauna bentônica, foram inseridas amostras de sedimentos de mesocosmos não contaminados previamente estabelecidos no CRHEA (conforme descrito em Moreira et al., 2017). Além disso, foram inseridas as macrófitas *Salvinia auriculata*, *Pistia stratiotes*, *Eichhornia crassiper* e *Myriophyllum aquaticum*, incluindo a fauna associada às raízes das mesmas, e amostras de zooplâncton e fitoplâncton coletadas no reservatório do Broa (Itirapina, São Paulo). Todos os mesocosmos permaneceram 6 meses em período de estabilização antes do início dos experimentos, permitindo, assim, a colonização por macroinvertebrados de fase adulta aérea.

Alocados aleatoriamente, os mesocosmos receberam 6 diferentes tratamentos com 3 repetições cada: controle não tratado (C); tratamento com o herbicida DMA[®] 806BR

(i.a. 2,4-D, Dow AdroSciences Industrial Ltda) (D); tratamento com o inseticida Regent[®] 800WG (i.a. fipronil, BASF AS) (F); tratamento com vinhaça (V); mistura do herbicida e do inseticida (M); e a mistura do 2,4-D, fipronil e vinhaça (MV) (Figura 1b).

Figura 1: Estruturas de colonização e mesocosmos (A); descarte de mesocosmos ao ar livre (B); tréplica de mesocosmo contaminada com mistura de maior escala (C).



Fonte: Acervo NEEA

As concentrações dos tratamentos foram calculadas com base nas doses recomendadas pelos fabricantes para aplicação na cultura da cana-de-açúcar na fase de pré-emergência: 3,5 L de DMA[®] 806BR ha⁻¹ (equivalente a 2,35 kg 2,4-D ha⁻¹) e 500 g de Regent[®] 800WG ha⁻¹ (equivalente a 400 g de fipronil ha⁻¹). Para o cálculo da dose de aplicação dos agrotóxicos, considerou-se um cenário de pulverização direta onde 100% dos compostos chegariam à superfície do ambiente aquático, como descrito em Pinto et al. (2021), considerando a área superficial de cada mesocosmos de 1,75 m. Esses cálculos resultaram no uso de 678 mg de 2,4-D (1 mL de DMA[®] 806BR) e 96 mg de fipronil (120 mg de Regent[®] 800 WG), para os tratamentos isolados e em mistura. O volume de vinhaça utilizado foi de 20L em cada mesocosmos, conforme recomendações de doses (L ha⁻¹) de agricultores locais (Pinto et al., 2021). Considerando o volume dos mesocosmos, a contaminação gerou uma concentração esperada de 447 µg L⁻¹ para o 2,4-D, 64 µg L⁻¹ para o fipronil e 1,3% (V/V) para a vinhaça, para os tratamentos isolados e misturas.

2.2. COLETA E ANÁLISE DA COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS

Os experimentos nos mesocosmos foram realizados na primavera e verão (outubro a abril). Para a avaliação da comunidade de macroinvertebrados, estruturas de colonização (Figura S1) foram construídas utilizando sacos de malha (abertura de 0,5 cm) contendo pedras, gravetos e folhas variadas coletadas em área de vegetação ripária nativa,

e a macrófita *S. auriculata* (seca a 60 °C por 48h) retiradas de cultivos externos. Um total de 16 estruturas foram inseridas no fundo de cada mesocosmos, 50 dias antes do início das amostragens para garantir a colonização por parte da fauna de macroinvertebrados. As estruturas foram coletadas 7 (T-7) e 1 (T-1) dia antes e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação. Em cada coleta, duas estruturas (subamostras) foram retiradas de cada mesocosmo cuidadosamente para manter os organismos aderidos ao material. As amostras foram preservadas, em campo, com etanol 70% para análises posteriores.

Para quantificação dos agrotóxicos, foi coletado 1L de água em garrafas estéreis de vidro e 1L de água foi coletado em garrafas de polietileno para análises físico-química e de nutrientes. Essas amostragens ocorreram nos mesmos dias em que as estruturas de colonização foram retiradas. Também, no dia da contaminação, foram coletadas amostras de água (1L) para análise de metais. Parâmetros da qualidade da água avaliados *in loco* como temperatura, potencial hidrogeniônico (pH), oxigênio dissolvido (OD), turbidez e condutividade elétrica, foram aferidos através de sonda multiparâmetro (HORIBA - U10) e clorofila *a* através de clorofilômetro (Aquafluor).

2.3.COMPOSIÇÃO, ÍNDICES ECOLÓGICOS E DIVERSIDADE FUNCIONAL DA COMUNIDADE

Após a coleta das estruturas de colonização, o material preservado foi lavado em água corrente em peneira de malha de 210 µm, para retenção dos organismos, os quais foram depositados em uma bandeja sob uma caixa de luz, triados, separados em morfotipos e novamente preservados em etanol 70% para identificação posterior. Os organismos foram identificados a nível de família utilizando chaves taxonômicas disponíveis (Hamada et al., 2014; adaptado de McCafferty, 1981). A família Chironomidae foi separada nas subfamílias Chironominae, Tanypodinae e Orthocladiinae. Finalmente, a identificação da subclasse Oligochaeta permaneceu nesse nível taxonômico. Realizada a etapa de identificação da composição da comunidade de macroinvertebrados, foram calculados os índices ecológicos de abundância relativa, índice de riqueza (Odum, 1984), índice de dominância (Magurran, 2004), diversidade de Shannon-Wiener (PIELOU, 1974), e índice de equitabilidade (Odum, 1984). Além disso, as famílias foram separadas em grupos funcionais alimentares, conforme classificação proposta por Cummins et al. (2005); Damanik-Ambarita et al. (2016) e Ramírez e

Gutiérrez-Fonseca (2014). A classificação de acordo com o grupo funcional alimentar (GFA) para cada família é apresentada como material suplementar (Tabelas S1).

2.4. ANÁLISES DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS, METAIS E CONTAMINANTES

As análises físico-químicas e biológicas da água e físico-química do sedimento (metais e agrotóxicos) foram feitas seguindo o cronograma de coleta das estruturas de colonização, conforme mencionado anteriormente. Para a análise da água, utilizando o método de titulometria foi analisada a dureza (NBR 5762, 1977), com o método de espectrometria foram analisadas as variáveis fósforo dissolvido total (Andersen, 1976), íon amônio (Koroleff, 1976), nitrito e nitrato (Mackereth; Heron e Tallinn, 1978), nitrogênio total (APHA, 1995) e turbidez (Espectrofotômetro Hack DR, 2000).

Nas amostras de água, a concentração de agrotóxicos foi verificada por cromatografia acoplada a espectrofotometria de massas (Goulart et al., 2020). Além disso, a concentração de metais na vinhaça pura usada na contaminação e nas amostras foi analisada por espectrometria de absorção atômica direta (AA 240FS VARIAN) (APHA, 2018). A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) foi determinada pelo consumo de oxigênio no tempo de incubação de 5 dias e a demanda química de oxigênio (DQO) pelo método de refluxo fechado (APHA, 2018) em uma alíquota de vinhaça pura.

2.5. ANÁLISE DE DADOS

Os efeitos dos agrotóxicos e da vinhaça nos índices ecológicos foram verificados por ANOVA de modelos mistos seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Para isso, os diferentes tratamentos foram tratados como efeitos entre fatores e os tempos amostrais como efeitos dentro dos fatores (medidas repetidas). A esfericidade das medidas repetidas foi avaliada pelo teste de Mauchly e no caso de não atendimento desse parâmetro a correção de Greenhouse-Geisser foi aplicada nos dados temporais. Além disso, a relação entre os índices ecológicos e as variáveis físico-químicas da água foi avaliada por meio de regressão múltipla. Para isso, cada índice foi tratado como variável resposta (dependente) em modelos separados e todas as variáveis físico-químicas da água e de concentração de agrotóxicos foram inseridas dentro de cada modelo como variáveis explicativas (independentes). Para cada análise, as variáveis significativas ($p < 0,05$)

foram inseridas no modelo buscando o melhor ajuste (R^2). Todas as análises foram feitas no programa Statistica 7.0 (StatSoft).

O conjunto de dados da comunidade de macroinvertebrados e das variáveis físico-químicas foram sintetizados, separadamente, usando curvas de resposta principal (PRC). A PRC foi construída a partir de uma análise de redundância feita no programa CANOCO, 3.12 (BRAAK; SMILAUER, 2002), incluindo os dados da comunidade e das variáveis físico-químicas da série temporal construída a partir das amostragens nos mesocosmos. A significância da RDA foi avaliada pelo teste de permutação de Monte Carlo usando 499 permutações (Van Den Brink; Ter Braak, 1999), com $p < 0,05$ sendo considerado significativo. A PRC foi construída usando os pesos de cada variável para cada tratamento obtidos para o eixo principal da RDA. Essa análise resulta em um diagrama que mostra o dia de amostragem no eixo x e o primeiro componente principal dos efeitos da comunidade de tratamentos no eixo y. Dessa forma, o diagrama mostra os desvios no tempo dos tratamentos em comparação com o controle. Além disso, um diagrama separado apresenta os pesos de cada uma das famílias/variáveis. As famílias/variáveis com alto peso positivo apresentam uma resposta semelhante à indicada pela PRC, enquanto as famílias/variáveis com peso negativo mostram o uma resposta oposta à indicada pela PRC. Famílias/variáveis com peso próximo ou igual a zero não são influenciadas pelos tratamentos ou apresentam uma resposta que não é representada pela PRC.

3. RESULTADOS

3.1.DESCRICÃO DOS CONTAMINANTES

3.1.1. VINHAÇA

A vinhaça pura utilizada foi caracterizada com pH ácido (3,91), altas concentrações de DBO (46500 mg L^{-1}) e DQO (107000 mg L^{-1}), bem como altos níveis de fósforo (150 mg L^{-1}) e nitrogênio total (639 mg L^{-1}), condutividade elétrica ($8,42 \text{ mS cm}^{-1}$) e dureza ($3500 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$). Os parâmetros físico-químicos da vinhaça bruta aplicada nos mesocosmos são fornecidos na Tabela S2. A vinhaça também apresentou altas concentrações de potássio (3360 mg L^{-1}), cálcio (1140 mg L^{-1}), alumínio (500 mg L^{-1}), magnésio (391 mg L^{-1}), ferro (247 mg L^{-1}), sódio (60 mg L^{-1}) e outros metais tais como manganês (3360 mg L^{-1}), zinco ($1,23 \text{ mg L}^{-1}$), cobre (3 mg L^{-1}), chumbo ($0,340 \text{ mg}$

L⁻¹) e cromo (0,207 mg L⁻¹). A alta composição de metais podem elevar a condutividade e salinização da água.

3.1.2. AGROTÓXICOS

Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D quantificados nos mesocosmos ao longo do experimento após a contaminação. Nos mesocosmos controle, foram encontradas pequenas concentrações de 2,4-D e fipronil. Além disso, nos mesocosmos contendo 2,4-D, foram observadas diminuições das concentrações ao longo do tempo e não foram observadas concentrações de fipronil acima do limite de quantificação somente em T-7. Nos mesocosmos tratados com fipronil foi observado um aumento nas concentrações a partir de T1 e diminuição até T150, e para fipronil sulfide (Fd) e fipronil sulfona (Fn) foram encontradas concentrações menores que o limite de quantificação até o tempo T14, porém a presença desses dois metabólitos foi quantificada nos tempos seguintes, no qual, também foram diminuindo gradativamente até T150. Nos mesocosmos com tratamentos M e MV foram observadas concentrações de 2,4-D e fipronil em todos os tempos, diminuindo ao longo do tempo até T150, com exceção de concentrações de 2,4-D em T-7 para ambos os mesocosmos. Nestes tratamentos, as concentrações de Fd estiveram abaixo do limite de quantificação até T7, sendo maiores nos tempos posteriores, assim como para Fn no mesocosmos MV. No mesocosmos M foram observadas concentrações acima do limite de quantificação em T1 e T7.

Tabela 1: Concentrações médias de agrotóxicos ao longo do tempo ($\mu\text{g L}^{-1}$). As abreviaturas correspondem às moléculas de fipronil (F), sulfeto de fipronil (Fd) e fipronil sulfona (Fn). Os tratamentos são controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de agrotóxicos (M), vinhaça (V) e mistura de agrotóxicos com vinhaça (MV). LOQ = Limite de Quantificação.

	C				D				F			
	D	F	Fd	Fn	D	F	Fd	Fn	D	F	Fd	Fn
T1	0,0954 ± 0,16	0,006 ± 0,013	< LOQ	< LOQ	1385 ± 268,41	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	42,54 ± 11,22	< LOQ	< LOQ
T7	0,1964 ± 0,084	0,0044 ± 0,001	< LOQ	0,0004 ± 0,0002	522,53 ± 54,44	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	7,96 ± 1,04	< LOQ	< LOQ
T14	0,1348 ± 0,04	0,0047 ± 0,002	< LOQ	0,0007 ± 0,00001	375,57 ± 30,22	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3,23 ± 1,14	< LOQ	< LOQ
T21	0,062 ± 0,052	0,009 ± 0,014	0,0002 ± 0,0006	0,0014 ± 0,002	484,86 ± 102,39	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3,52 ± 1,24	0,065 ± 0,028	0,1683 ± 0,090
T75	0,0121 ± 0,003	0,0007 ± 0,00	0,0001 ± 0	0,0002 ± 0,0001	122,14 ± 78,85	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,0313 ± 0,007	0,0998 ± 0,0852	0,0023 ± 0,0012	0,0027 ± 0,015
T150	0,0137 ± 0,0104	0,0002 ± 0,0002	< LOQ	0,00004 ± 0,00005	6,87 ± 10,85	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,0102 ± 0,0123	0,0027 ± 0,0019	0,0022 ± 0,0011	0,0039 ± 0,0025
	M				V				MV			
	D	F	Fd	Fn	D	F	Fd	Fn	D	F	Fd	Fn
T1	1168 ± 438,68	38,39 ± 0,39	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,449 ± 0,36	0,0012 ± 0,0005	0,0045 ± 0,002	1658 ± 1735	16,94 ± 0,34	< LOQ	< LOQ
T7	488,74 ± 20,25	10,69 ± 0,12	< LOQ	0,12 ± 0,20	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	318,54 ± 28,28	6,56 ± 1,37	< LOQ	< LOQ
T14	401,88 ± 65,67	5,69 ± 0,3	< LOQ	< LOQ	0,093	0,0148	< LOQ	< LOQ	208,6	6,0	< LOQ	< LOQ
T21	539,73 ± 27,60	5,27 ± 0,13	0,080 ± 0,013	0,1367 ± 0,018	0,148	0,006	< LOQ	< LOQ	233,6	7	0,050	0,060
T75	239,55 ± 34,679	0,1 ± 0,072	0,0131 ± 0,0134	0,0132 ± 0,011	0,1861 ± 0	0,0042 ± 0	< LOQ	< LOQ	0,7	3,5	0,3054	0,1081
T150	91,3288 ± 15,8386	0,0243 ± 0,0088	0,0265 ± 0,0183	0,038 ± 0,027	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,055	0,0877	0,1356	0,0428

3.1.3. METAIS

A concentração de metais na água, analisada no dia da contaminação dos mesocosmos é apresentada na Tabela 2. A aplicação da vinhaça provocou as maiores alterações na concentração de metais na água, com destaque para o aumento em 10 vezes na concentração do manganês e em 20 vezes na concentração de potássio no tratamento V, em comparação com mesocosmos controle ($p < 0,05$). Ainda, em comparação com o tratamento controle, foi observado também o aumento nas concentrações de bário, cobalto, cobre e zinco.

Tabela 2: Concentrações (média \pm SE) de metais em água (mg L⁻¹) dos mesocosmos de controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de agrotóxicos (M), vinhaça (V) e mistura de agrotóxicos com vinhaça (MV) em amostras coletadas após contaminação.

VARIÁVEIS	C	D	F	M	V	MV
Alumínio (mg L ⁻¹)	1,4 \pm 0,7	4,9 \pm 2,9*	5,2 \pm 3,8*	3,7 \pm 1,1	3,3 \pm 1,0	3,4 \pm 0,3
Bário (mg L ⁻¹)	0,004 \pm 0,002	0,01 \pm 0,004	0,05 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01*	0,03 \pm 0,002*	0,03 \pm 0,01*
Cádmio (mg L ⁻¹)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Cobalto (mg L ⁻¹)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,005 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01*	0,06 \pm 0,01*
Cromo (mg L ⁻¹)	< LOQ	0,0005 \pm 0,0001	0,0005 \pm 0,0005	< LOQ	0,001 \pm 0,001*	0,0003 \pm 0,00
Cobre (mg L ⁻¹)	0,02 \pm 0,005	0,04 \pm 0,01*	0,03 \pm 0,01*	0,04 \pm 0,004*	0,05 \pm 0,002*	0,06 \pm 0,01*
Chumbo (mg L ⁻¹)	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,003	0,02 \pm 0,02	< LOQ	0,02 \pm 0,001	0,01 \pm 0,003
Manganês (mg L ⁻¹)	0,09 \pm 0,03	0,2 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	0,9 \pm 0,5*	0,8 \pm 0,1*
Níquel (mg L ⁻¹)	0,003 \pm 0,004	0,001 \pm 0,001	0,002 \pm 0,002	0,002 \pm 0,004	0,001 \pm 0,002	0,01 \pm 0,02
Potássio (mg L ⁻¹)	3,3 \pm 0,6	4,5 \pm 0,4	4,6 \pm 1,2	4,9 \pm 1,4	62,2 \pm 3,1*	65,1 \pm 3,7*
Zinco (mg L ⁻¹)	0,009 \pm 0,01	0,004 \pm 0,004	0,03 \pm 0,01	0,05 \pm 0,05	0,06 \pm 0,01*	0,1 \pm 0,07*

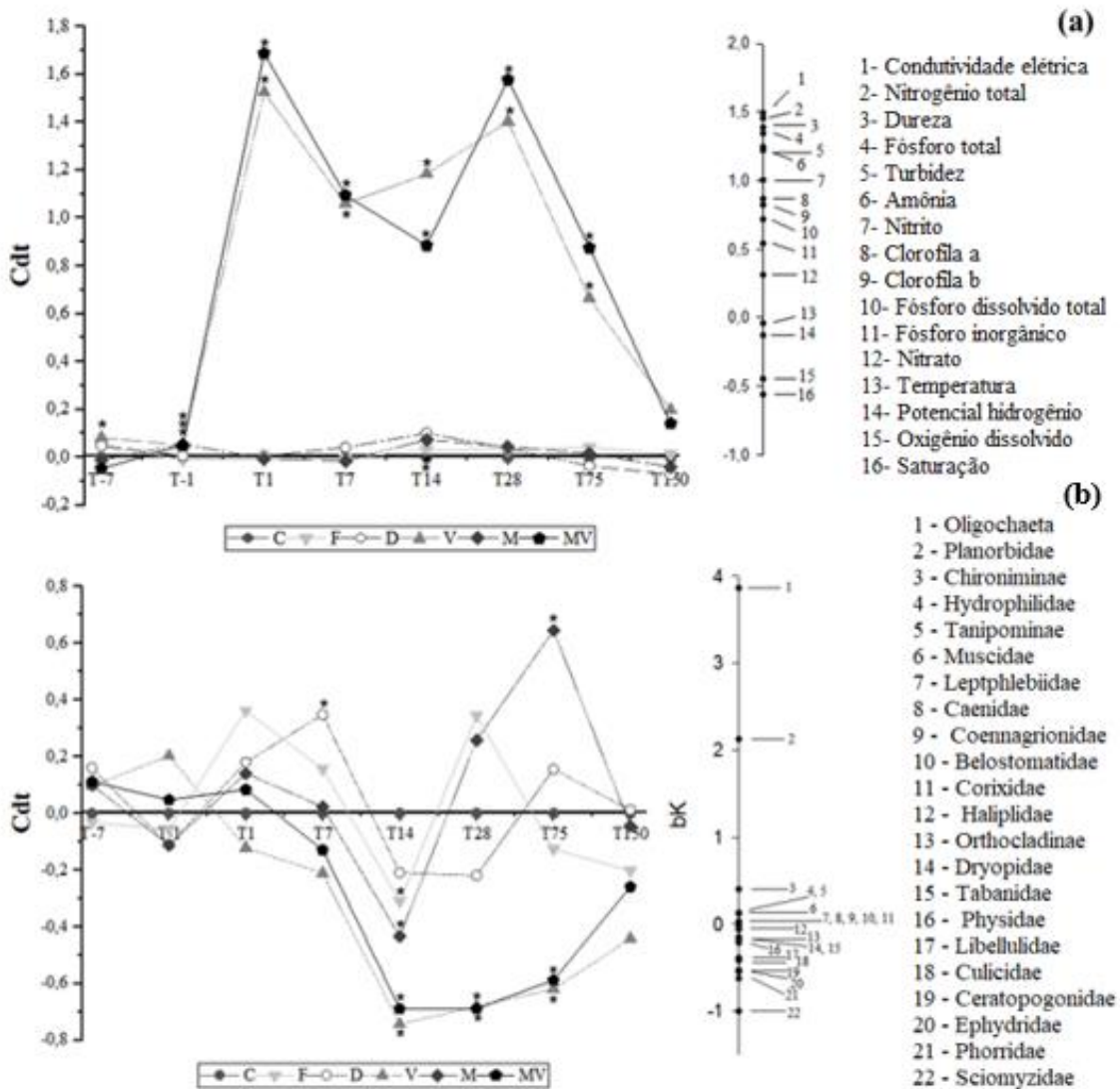
Asteriscos e valores em negrito (*) indicam diferenças do controle do mesocosmo. LOQ (Limite de quantificação), sendo 0,008 mg L⁻¹ para Cádmio, 0,009 mg L⁻¹ para Cobalto, 0,00006 mg L⁻¹ para Cromo e 0,008 mg L⁻¹ para Chumbo.

3.2.VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA

A PRC para as variáveis físico-químicas medidas nos mesocosmos é mostrada na Figura 2a. O teste de permutação de Monte Carlo indicou a significância da PRC ($p = 0,05$, 499 permutações). Na análise, 71% de toda variação pode ser atribuída ao tempo, o qual é disposto no eixo horizontal (eixo x). Da variação total, 46% pode ser atribuída aos tratamentos, que são apresentados nos diagramas. Para os tratamentos recebendo apenas

os agrotóxicos, isolados e em mistura (D, F, M), não houveram desvios significativos em relação aos mesocosmos controle para nenhum tempo amostral ($p > 0,05$). Do tempo T1 ao tempo T75, houveram desvios significativos nos tratamentos V e MV em relação ao controle ($p < 0,05$) e as variáveis condutividade elétrica, nitrogênio total e dureza, seguidas das variáveis fósforo e turbidez apresentaram afinidade à resposta indicada pela PRC, tendo seus valores aumentados nos tratamentos contaminados pela vinhaça (Tabela S3).

Figura 2: Curva de resposta principal das variáveis físico-químicas (a) e dos macroinvertebrados bentônicos (b) de mesocosmos controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de agrotóxicos (M), vinhaça (V) e mistura de pesticidas com vinhaça (MV) durante um período de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação.



Por outro lado, as variáveis que apresentaram uma resposta inversa ao indicado pela PRC nos tratamentos V e MV, que apresentaram desvios significativos, foram a temperatura e pH da água, oxigênio dissolvido e saturação de OD. Esses parâmetros tiveram seus valores diminuídos nos mesocosmos que receberam a vinhaça. Nesse sentido, é possível observar na Tabela S3 a diminuição nos valores de pH nos tratamentos V e MV, caracterizando a água como mais ácida, nos períodos de T1 a T14, voltando para valores próximos medidos antes da contaminação (acima de 6,5) nos tempos T21, T75 e T150. Da mesma forma, os valores de OD diminuíram após a contaminação em V e MV e permaneceram abaixo de 1 mg L⁻¹ até o fim do experimento. No T150, não houveram desvios significativos em relação ao controle para V e MV, indicando uma recuperação do sistema que voltou a apresentar características próximas ao controle, apesar dos baixos valores de oxigênio dissolvido.

3.3.COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS

3.3.1. COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE

Um total de 19 famílias distribuídas em 7 ordens e na subclasse Oligochaeta foram encontradas nos mesocosmos ao longo de todo o experimento, sendo estes pertencentes às famílias Libellulidae e Coenagrionidae (Ordem Odonata), Planorbidae (Ordem Pulmonata), Hydrophilidae, Haliplidae e Dryopidae (Ordem Coleoptera), Leptophlebiidae e Caenidae (Ordem Ephemeroptera), Physidae (Ordem Basommatophora), Corixidae e Belostomatidae (Ordem Hemiptera) e Phoridae, Ephydriidae, Sciomyzidae, Tabanidae, Muscidae, Culicidae, Ceratopogonidae (Ordem Diptera) e as subfamílias Chironominae e Tanypodinae (Família Chironomidae) também pertencentes à Ordem Diptera. Essas famílias totalizam 3066 organismos identificados, dos quais o maior número foi encontrado no controle (966 organismos).

A PCR obtida para a abundância de macroinvertebrados é mostrada na Figura 1b. Nela, 79% de toda variação é atribuída ao tempo, disposto no eixo horizontal, e 32% pode ser atribuída aos tratamentos. O teste de permutação de Monte Carlo indica a significância da análise ($p = 0,05$, 499 permutações). Antes da contaminação, não houve desvio de nenhum tratamento em relação ao controle ($p > 0,05$), indicando uma composição inicial similar. Após a contaminação, no tempo T7 houve desvio significativo ($p < 0,05$) do controle no tratamento D. Nessa coleta, a subclasse Oligochaeta apresentava o dobro de indivíduos no tratamento contendo 2,4-D em relação ao controle (Tabela S1). Por outro

lado, no tempo T14, todos os tratamentos, exceto o 2,4-D, diferenciam-se estatisticamente ($p < 0,05$) do controle. Nesse período, observou-se a presença de organismos da família Chironomidae apenas nos mesocosmos controle e tratados com 2,4-D e o desaparecimento desses organismos nos demais tratamentos (Figura 2b e Tabela S1). No tempo T28, apenas os tratamentos contendo vinhaça, isolada e em mistura, diferenciam-se estatisticamente do controle ($p < 0,05$). Nesses mesocosmos, além de ser evidenciado o desaparecimento dos organismos da subclasse Oligochaeta (Figura 2b), houve o aparecimento de organismos das famílias Phoridae, Ephydriidae e Sciomyzidae, que não foram encontrados em nenhum outro tratamento ou período amostral, além do T28.

Os organismos da subclasse Oligochaeta, seguidos da família Planorbidae, indicaram afinidade à resposta indicada pela PRC. No tratamento MV, no tempo T75, o número de indivíduos desses dois grupos foi reduzido ($p < 0,05$, Figura 2b). Por outro lado, alguns indivíduos como os pertencentes à família Haliplidae, Libellulidae, Ceratopogonidae, Phoridae, Culicidae, Ephydriidae e Sciomyzidae apresentaram resposta inversa na presença da vinhaça isolada e em mistura, tendo um número maior de indivíduos dessas famílias nos tempos T14, T28 e T75 nos tratamentos V e MV (Tabela S1). No tempo T150, não houve diferença (desvios) entre o controle e nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$).

3.3.2. ÍNDICES ECOLÓGICOS, ABUNDÂNCIA E ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA

Considerando o índice ecológico de dominância, não houveram diferenças entre os tratamentos (ANOVA de modelos mistos, $F = 0,472$ e $p = 0,79$) e entre os períodos amostrais (ANOVA de modelos mistos, $F = 1,712$ e $p = 0,11$). Da mesma forma, não houve efeito na interação entre esses dois fatores (ANOVA de modelos mistos, $F = 1,411$ e $p = 0,0955$), indicando que não houveram diferenças entre os tratamentos ao longo do tempo. A análise de regressão múltipla mostrou que as variáveis que se relacionam significativamente com o índice de dominância foram OD, turbidez (relação inversa) e nitrogênio total (relação direta) (Tabela 3). Ao observar os valores da regressão, percebe-se que o oxigênio teve maior peso explicativo em relação a dominância, expressando uma relação inversa entre a diminuição das concentrações de oxigênio e aumento da dominância. Embora nos tratamentos onde foram detectadas as menores concentrações de oxigênio após a contaminação (V e MV), percebe-se o aumento desse índice (Figura 3), diferenças significativas não foram detectadas pela análise de variâncias.

Tabela 3: Regressão múltipla de índices ecológicos de dominância, diversidade de Shannon, riqueza de famílias e abundância de organismos, aplicados em relação a parâmetros físico-químicos medidos na água do mesocosmo ao longo do tempo. Os valores dos coeficientes β (pesos) de cada variável adicionada ao modelo ($p < 0,05$) são apresentados ao lado da equação. Onde OD - oxigênio dissolvido, NT - nitrogênio total (mg L⁻¹), Turb - Turbidez (NTU), Cond - Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$), Fip - concentração de fipronil ($\mu\text{g L}^{-1}$) e Clo a - clorofila uma concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$).

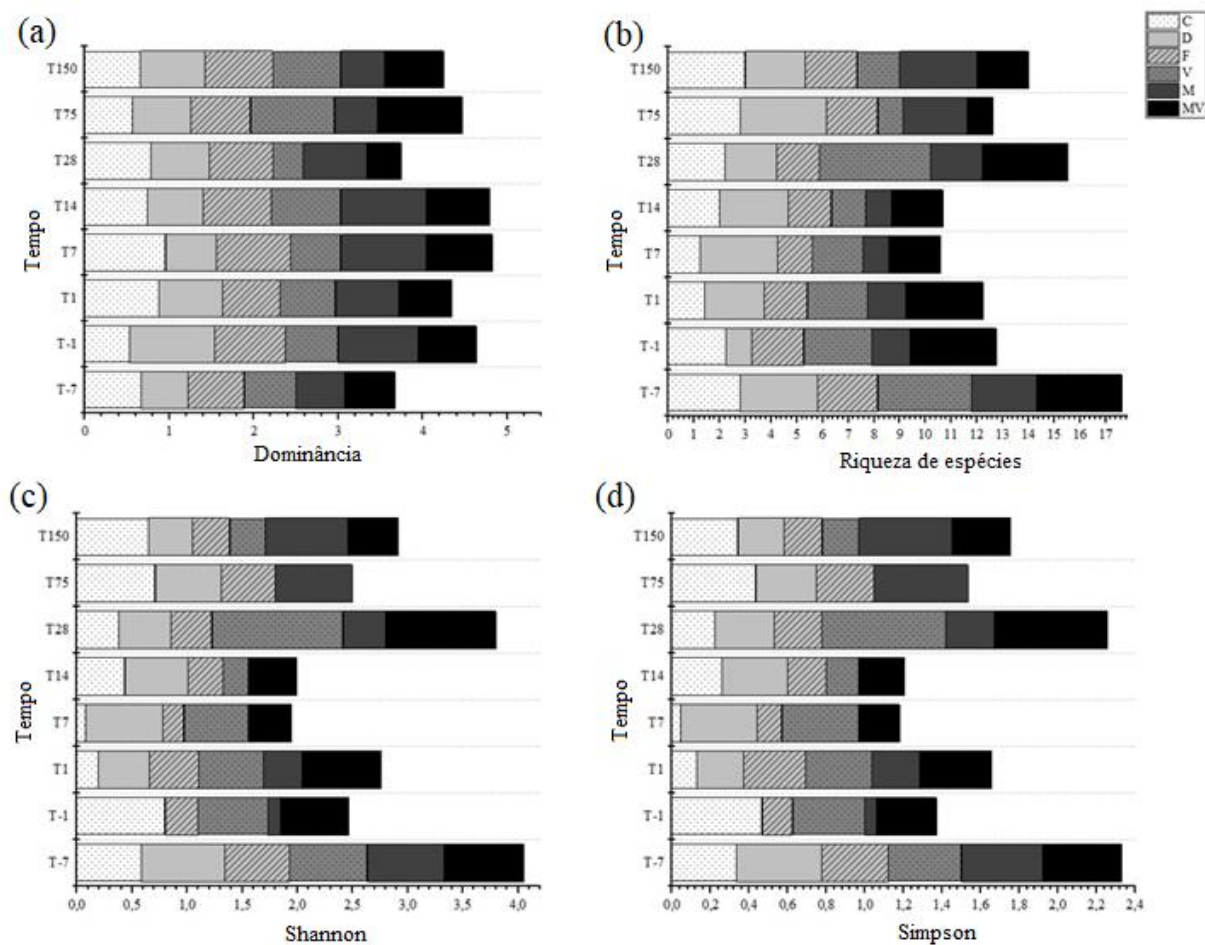
Estimativa	R ² ajustado	F	p	Erro padrão
Dominância = $0,121 - 0,052*OD - 0,081*NT + 0,004*Turb,$	0,55	2,99	0,01	0,12
Diversidade = $1,779 + 0,145*NT + 0,086*OD - 0,009*Fip - 0,007*Turb,$	0,60	2,34	0,03	0,22
Riqueza = $5,683 + 0,277*NT + 0,201*OD - 0,036*Fip - 0,017*Turb,$	0,38	3,58	0,004	0,65
Abundância = $- 55,567 + 8,491*pH + 4,015*OD + 0,524*Clo,a - 0,496*Fip - 0,074*Cond,$	0,50	6,52	< 0,001	12,84

Para a riqueza de famílias, não foram detectadas diferenças considerando apenas os tratamentos (ANOVA de modelos mistos, $F = 2,991$ e $p = 0,056$). Em contrapartida, ocorreram diferenças entre os períodos amostrais (ANOVA de modelos mistos, $F = 3,277$ e $p < 0,05$), sendo o T-7 diferente de todos os outros períodos amostrais, como observado na Figura 3. Da mesma forma, houve um efeito significativo na interação entre os tratamentos e o tempo (ANOVA de modelos mistos, $F = 1,578$ e $p < 0,05$), indicando que houveram diferenças entre os tratamentos ao longo do tempo. Nesse sentido, houve uma diminuição na riqueza nos tratamentos D nos tempos 28 e 150 dias após a contaminação. Além disso, houve um aumento em V no T7 e MV no T1 e T28. Essas comparações foram detectadas em relação ao controle nos mesmos dias amostrais ($p < 0,05$).

Na análise de regressão múltipla, as variáveis que apresentaram relação significativa com a riqueza foram nitrogênio total e OD (relação direta) e concentração de fipronil e turbidez (relação inversa) ($p < 0,05$). Ao observar a Figura 3, percebe-se que a riqueza foi menor em T7 e T14. Os parâmetros nitrogênio e oxigênio tiveram o maior poder explicativo (peso) da riqueza de famílias nos mesocosmos. Nesse sentido, a riqueza foi maior nos tratamentos com maiores concentrações de nitrogênio e melhores condições de oxigênio. De forma contrária, apesar do menor poder explicativo, um aumento da concentração de fipronil, aplicado nos mesocosmos F, M e MV, e turbidez que foi

associada principalmente à presença da vinhaça em V e MV (Tabela 3), foi relacionada a uma diminuição da riqueza.

Figura 3: Índices de diversidade para dominância (a), riqueza de espécies (b), Shannon (c) e Simpson (d) de controle de mesocosmos (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de pesticidas (M), vinhaça (V) e mistura de agrotóxicos com vinhaça (MV) durante um período de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação.

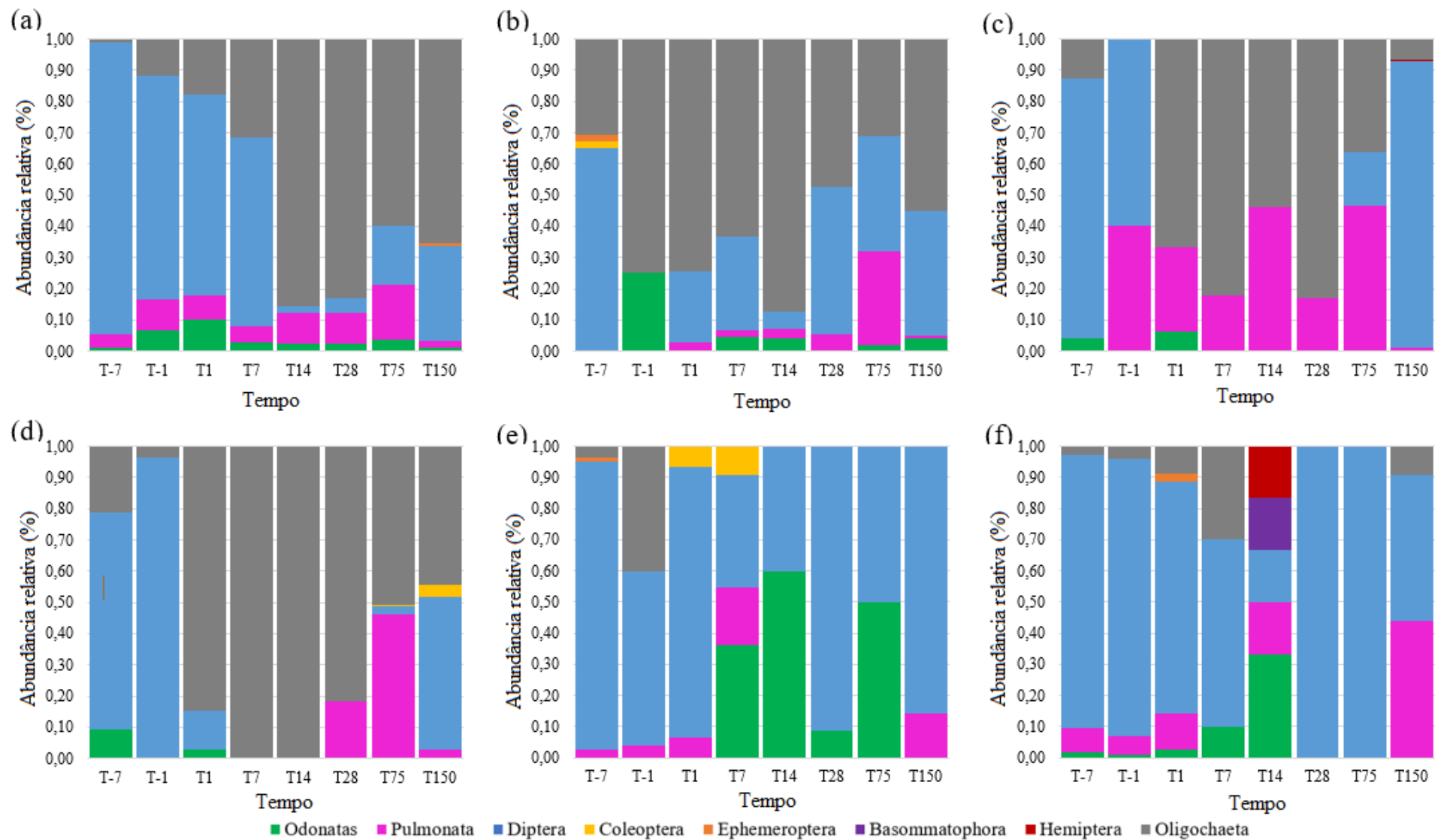


Diferenças estatísticas também não foram observadas entre os tratamentos para o índice de diversidade Shannon e Simpson (ANOVA de modelos mistos, $F = 0,902$ e $0,472$ e $p = 0,506$ e $0,791$) e entre os períodos amostrais (ANOVA de modelos mistos, $F = 1,875$ e $1,171$ e $p = 0,081$ e $0,115$). Na interação entre os tratamentos e os tempos amostrais, também não foi observado efeito significativo (ANOVA de modelos mistos, $F = 1,389$ e $1,411$ e $p = 0,105$ e $0,096$), indicando que ao longo do tempo não houveram diferença entre os tratamentos (Figura 3). A análise de regressão múltipla para o índice de Simpson não foi significativa ($p > 0,05$). De forma contrária, o índice de Shannon apresentou

relação significativa direta com o nitrogênio total e OD e inversa com a concentração de fipronil e turbidez da água ($p > 0,05$), da mesma forma que o apresentado para a riqueza.

Para a abundância total de organismos (Figura 4), não foram detectadas diferenças entre os tratamentos (ANOVA de modelos mistos, $F = 0,754$ e $p = 0,597$). Em contrapartida, ocorreram diferenças entre os períodos amostrais (ANOVA de modelos mistos, $F = 3,037$ e $p < 0,05$), sendo o T150 diferente de todos os outros períodos amostrais. Como observado na Figura 3, de uma forma geral a abundância total de organismos nos tratamentos C, D, F e M no T150 aumentou, em comparação a outros períodos amostrais. Em relação a interação entre os tratamentos e o tempo não houve efeito significativo (ANOVA de modelos mistos, $F = 1,037$ e $p = 0,430$). A análise de regressão múltipla revelou que o pH da água e oxigênio tiveram o maior poder explicativo da abundância de organismos, com uma resposta direta entre o aumento dos valores dessas variáveis e o aumento da abundância. Ressalta-se que a diminuição dessas variáveis está diretamente relacionada à contaminação pela vinhaça (Figura 2a, Tabela S3). Além disso, outras variáveis tiveram um menor poder explicativo, como a concentração de clorofila *a* que também apresentou resposta direta, e de fipronil que apresentou resposta inversa. Por fim, a condutividade elétrica da água (resposta inversa) e a concentração do íon amônio (resposta direta) apresentaram os menores valores de β , no entanto significativos, com baixa influência na abundância. Alterações na concentração de clorofila, íon amônio e na condutividade elétrica também foram associadas à presença da vinhaça (Figura 2a).

Figura 4: Abundância relativa para os tratamentos controle (a), 2,4-D (b), fipronil (c), mistura de agrotóxicos (d), vinhaça (e) e mistura de agrotóxicos com vinhaça (f) durante um período de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação.



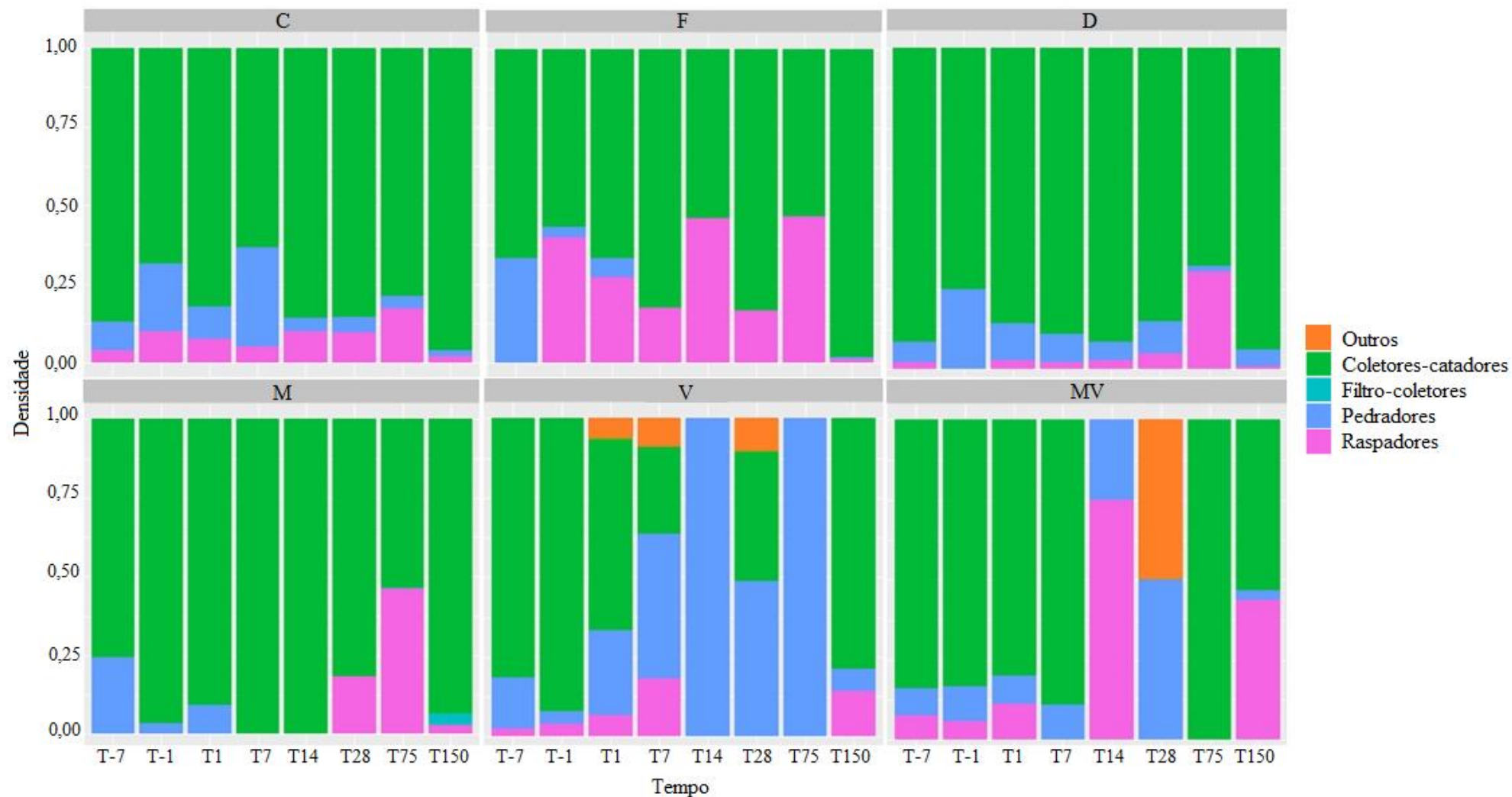
3.3.3. DIVERSIDADE FUNCIONAL DA COMUNIDADE

Os organismos foram classificados de acordo com os grupos funcionais alimentares e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 5. Foram verificadas alterações entre os tratamentos para a riqueza e diversidade funcional (ANOVA de modelos mistos, $F = 2,565$ e $p < 0,05$), com a diminuição desses parâmetros nos mesocosmos contaminados pela mistura de agrotóxicos ($p < 0,05$) em relação ao controle. Não foram detectadas diferenças temporais para esses parâmetros (ANOVA, $F = 1,767$ e $p = 0,125$). Considerando a abundância dos grupos funcionais de forma individualizada, não foram verificadas diferenças entre os tratamentos. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças temporais na abundância de predadores, coletores-catadores e raspadores (ANOVA, $F = 1,333$; $1,854$ e $0,685$, $p > 0,05$). No entanto, ressalta-se que há uma tendência de alteração desses parâmetros, que será melhor descrita a seguir, atestada pelos níveis de significância ($p < 0,1$).

No controle, é possível notar uma quantidade expressiva de coletores-catadores, seguido de predadores e raspadores. Embora ao longo do tempo observa-se uma alteração na quantidade de indivíduos representantes da classe de predadores e um aumento na abundância relativa dos coletores-catadores, no T150 não foram detectadas diferenças significativas. No tratamento contaminado pelo 2,4-D, também são encontrados organismos coletores-catadores, sendo essa classificação a mais abundante, bem como predadores e raspadores.

Nos mesocosmos contaminados pelo fipronil isolado e pela mistura de agrotóxicos, é possível observar a presença dos predadores antes da contaminação, em T-7 e T-1, e logo após a contaminação em T1. Após esse período, os predadores desapareceram nesses dois tratamentos, não sendo encontrados mesmo 150 dias após a contaminação. Nesses tratamentos, os organismos pertencentes à ordem Odonata e à subfamília Tanyptodinae, classificados como predadores, desapareceram nesses períodos, explicando as respostas observadas com os predadores. Além disso, para o tratamento F, no T7 e T14, foram encontrados apenas coletores-catadores, especificamente devido aos organismos da subclasse Oligochaeta. Além disso, filtro-coletores foram observados em M, devido ao aparecimento da família Hydrophilidae. A partir do T28, os raspadores surgiram nas amostras provenientes do tratamento com a mistura dos agrotóxicos.

Figura 5: Diversidade funcional de macroinvertebrados bentônicos para os tratamentos controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de agrotóxicos (M), vinhaça (V) e mistura de agrotóxicos com vinhaça (MV) durante um período de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação.



No tratamento V, houve o desaparecimento dos coletores-catadores e raspadores no T14 e T75, sendo que apenas predadores foram encontrados nesses tratamentos, devido a presença de organismos da família Libellulidae, Sciomyzidae e Ceratopogonidae. O mesmo aconteceu para MV no T75, quando apenas coletores-catadores foram encontrados nas amostras especificamente os pertencentes à subfamília Chironominae. Além disso, no T7 os raspadores não foram encontrados, e em T14 os coletores-catadores desapareceram, aumentando a abundância relativa dos raspadores.

4. DISCUSSÃO

4.1.QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA E CONCENTRAÇÕES DE PESTICIDAS

Logo após a contaminação dos mesocosmos que receberam os agrotóxicos (T1), as concentrações de fipronil detectadas em F, M e MV estiveram abaixo das concentrações máximas já detectadas em corpos d'água superficiais localizados em áreas de cultivo de cana de açúcar no Estado de São Paulo, que variaram de 6 a 465 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CETESB, 2018). Em contrapartida, as concentrações de 2,4-D em D, M e MV estiveram, inicialmente, acima dos valores detectados nesses ambientes aquáticos próximos às plantações de cana-de-açúcar, que alcançaram valores variando de 175,1 a 366,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CETESB, 2018). Resíduos dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D foram detectados no controle e tratamentos isolados, no entanto, conforme discutido por estudos anteriores, os valores encontrados são negligenciáveis em comparação com as concentrações nos tratamentos contaminados pelos agrotóxicos (Ogura et al., 2022; Pinto et al., 2021 e 2022).

Ao longo do tempo, houve uma diminuição das concentrações de ambos os agrotóxicos (degradação), no entanto, mesmo após 150 dias da contaminação, o herbicida 2,4-D foi encontrado em altas concentrações em D e M, muito acima dos valores reportados para corpos d'água ao redor do mundo, que variaram de 0,08 - 11,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ nos Estados Unidos, 0,0096 - 6,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ na China e 0,0014 - 1,12 $\mu\text{g L}^{-1}$ na União Europeia (Ensminger et al., 2013; Fang et al., 2019; Tsaboula et al., 2016). Concentrações de fipronil foram detectadas numa ordem de grandeza de nano gramas nos tratamentos F, M e MV. Em paralelo com isso, os metabolitos fipronil sulfide e sulfona, gerados a partir da molécula parental de fipronil, também foram detectados nos mesocosmos F, M e MV ao longo do tempo, estando em concentrações equiparáveis ao fipronil no fim de 150 dias. Estudos da literatura têm verificado que esses dois metabolitos apresentam uma toxicidade equiparável e/ou maior que a molécula parental para macroinvertebrados

dulcícolas, pertencentes às ordens Decapoda, Amphipoda, Diptera, Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera (Maul et al., 2008; Schlenk et al., 2001; Weston and Lydy, 2014). Esses resultados demonstram a importância de monitorar esses subprodutos, como feito no presente trabalho, e considerar a toxicidade e efeitos desses compostos na fauna de ambientes contaminados pelo fipronil. Atrelado a isso, estudos tem reportado que os metabolitos apresentam maior persistência na água e sedimento (Qu et al., 2016; Brennan et al. 2009; Maul et al., 2008), aumentando os riscos para a biota aquática.

Devido à quantidade de formulação comercial usada (1mL de DMA 806BR[®] e 120 mg Regent 800WG[®]), não eram esperadas alterações nas características físico-químicas da água nos tratamentos que receberam apenas os agrotóxicos (D, F e M), conforme atestado pela análise de PRC. Em contrapartida, a análise da vinhaça bruta usada nos experimentos demonstrou uma alta carga poluente, atestada pelos altos valores de DBO e DQO, nutrientes, conteúdo iônico e de metais, além do baixo pH. Devido a esse alto potencial poluidor, mesmo a aplicação de uma baixa proporção de vinhaça (1,3% v:v) provocou profundas alterações na qualidade da água, confirmada pelos desvios significativos na PRC, que persistiram até 75 dias após a contaminação.

A carga orgânica da vinhaça pode causar diversos impactos no ambiente aquático, como a proliferação de microrganismos em quantidades capazes de reduzir o oxigênio dissolvido na água, morte de animais e plantas aquáticas (Freitas et al., 2022; Ogura et al., 2022), assim como tornar os corpos d'água inadequados como fonte de água potável (Cristofolletti et al., 2013). A aplicação da vinhaça em V e MV causou uma drástica redução do OD da água, provocando condições próximas a anoxia em alguns períodos, corroborando com essa discussão da literatura. Alinhado com isso, ao estudar evidências de contaminação por vinhaça em um rio da região nordeste do Brasil, Gunkel et al. (2007) verificaram diminuições nos níveis de oxigênio da água em regiões a jusante de uma indústria sucroalcooleira e de áreas de cultivo de cana-de-açúcar fertirrigadas com vinhaça.

Uma elevada variação na condutividade elétrica foi diretamente associada aos tratamentos V e MV no presente estudo. Esse parâmetro foi o que apresentou a maior afinidade na PRC com os desvios detectados nos tratamentos contaminados pela vinhaça em comparação ao controle. Altos valores de condutividade elétrica foram encontrados nesses tratamentos após a contaminação, os quais podem ser explicados pelas altas concentrações, na vinhaça bruta, de cátions de potássio, cálcio, alumínio, magnésio, sódio e outros metais e ânions como fosfato, nitrato, nitrito, dentre outros não quantificados no

presente trabalho. O uso da vinhaça na fertirrigação pode aumentar a concentração de nutrientes, especialmente potássio, nitrogênio, e fósforo, e de íons no solo, muito acima da demanda nutricional das culturas, comprometendo a sua produtividade e propiciando processos de lixiviação desses compostos para os corpos hídricos adjacentes (Nunes et al., 2022), com conseqüente alteração da qualidade da água.

No estudo de Gunkel et al. (2007) supracitado, a fertirrigação da cana-de-açúcar foi a principal fonte poluidora do rio Ipojuca (Recife, Brasil) causando o aumento na temperatura, turbidez e acidificação da água, além da redução do oxigênio, já destacada anteriormente. Uma forte relação entre a contaminação com vinhaça e aumento da turbidez e diminuição do pH da água também foi observada no presente estudo. A turbidez é aumentada quando há uma grande quantidade de material em suspensão e, assim, acaba comprometendo a atividade fotossintética de organismos autótrofos presentes no ambiente aquático (Nunes et al., 2022). Diferentes estudos da literatura já têm evidenciado que o baixo pH, normalmente menor que 4, é uma das principais características da vinhaça da cana-de-açúcar (Karp et al., 2022; (Palacios-Bereche et al., 2022; Piffer et al., 2022). Nos tratamentos contaminados com a vinhaça, o pH foi o parâmetro que apresentou a resposta inversa mais significativa com os tratamentos V e MV indicados pela PRC, atestando esse processo de acidificação do corpo hídrico.

Dentre as diversas implicações associadas à redução do pH da água, ressalta-se que condições mais ácidas aumentam a solubilidade de metais (WHO, 2006) alterando, conseqüentemente, a biodisponibilidade desses compostos no ambiente aquático (CETESB, 2009). Altas concentrações de metais, associadas a condições ácidas do meio, contribuem significativamente para o potencial poluidor da vinhaça (Freire e Cortez, 2000; Oliveira et al., 2020). Nesse sentido, a presença de vinhaça, em V e MV, provocou um aumento na concentração de diversos metais na água, medidos após a contaminação. Diversos autores já associaram a alta concentração de metais, especialmente Cd, Cr, Ni, Pb, K, P, S, Fe, Mn, Zn e Cu, com efeitos a organismos expostos à vinhaça (Pedro-Escher et al., 2014, Souza et al., 2013, Srivastava e Jain, 2010), cujas implicações para a fauna de macroinvertebrados serão posteriormente discutidas.

4.2. EFEITOS NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS

Nos ecossistemas aquáticos, as comunidades biológicas possuem uma relação direta com as variações ambientais, alterando sua estrutura, composição e comportamento ao passo que atributos biológicos, físicos e químicos do ambiente são alterados (Serrano

Balderas et al., 2016). Da mesma maneira, os macroinvertebrados bentônicos sofrem influências de diversos fatores sobre sua composição e estrutura (Van de Meutter et al., 2005), podendo haver a colonização de espécies, principalmente daquelas com dispersão adulta aérea, desaparecimento ou redução da abundância de alguns grupos em detrimento do aumento de outros, conforme o grau de distúrbio ambiental experimentado (Loeb, 1993). Atrelado a isso, a interferência dos processos naturais por fatores antropogênicos, como a poluição por agrotóxicos ou resíduos industriais, tal qual a vinhaça de cana-de-açúcar, pode provocar profundas alterações na comunidade de macroinvertebrados bentônicos, principalmente porque esse grupo inclui espécies com ciclo de vida que contempla a coluna d'água e sedimento, aumentando a rota de exposição desses organismos que vivem e se alimentam em uma ou ambas as matrizes eventualmente contaminadas (Castro-català et al., 2016).

Por ser um herbicida, o mecanismo de ação do 2,4-D é descrito para o controle de plantas dicotiledôneas, na qual esse agrotóxico é primariamente usado (Islam et al., 2018). No entanto, estudos na literatura têm previamente descrito que esse herbicida pode provocar efeitos para invertebrados aquáticos (e.g. Park et al., 2010; Pinto et al., 2021a e 2021c; Browne et al., 2014, Benli et al., 2007). Nesse sentido, houve um desvio significativo da resposta do 2,4-D no T7 na PRC, atribuído, principalmente, ao aumento da abundância de organismos da subclasse Oligochaeta, além da diminuição no número de Tanyptodinae e Chironominae nesse período. Os estudos de Park et al. (2010) e Pinto et al. (2021c), citados anteriormente, já reportaram respostas adversas a larvas de quironomídeos expostos a esse herbicida, sendo que o efeito observado no presente estudo pode ser atribuído a alta concentração inicial de 2,4-D nos mesocosmos. Em um estudo em poças artificiais contaminadas por 2,4-D, Stepherson e Mackie (1986) não verificaram efeitos diretos sobre a fauna de macroinvertebrados bentônicos, no entanto, meses após a contaminação, houve um efeito indireto na comunidade pela dominância de oligoquetas da família Tubificidae. Nesse mesmo sentido, uma hipótese para o aumento dos oligoquetas no presente estudo pode ser atrelada a uma resposta indireta, pela redução da competição por recursos alimentares causada pela diminuição de organismos da subfamília Chironominae.

De forma similar ao estudo de Stepherson e Mackie (1986), também foram observados efeitos tardios (T28 e T150) de redução na riqueza de espécies nos mesocosmos tratados com 2,4-D isoladamente. Nesse mesmo sentido, Harrahy, Edwards e Hedman (2014) verificaram uma correlação significativa e inversa entre o tempo (dias

após aplicação) e a riqueza de macroinvertebrados em dois lagos tratados com 2,4-D para o controle da macrófita invasora *Myriophyllum spicatum* L. Esses estudos, juntos, trazem um peso de evidência acerca dos possíveis efeitos, direto e indiretos, do herbicida 2,4-D para macroinvertebrados aquáticos, ressaltando os riscos associados a esse herbicida, visto a importância dessa assembleia biológica dentro dos ecossistemas aquáticos e terrestres adjacentes (Balian et al., 2008).

Os insetos aquáticos representam, em termos taxonômicos, aproximadamente 60% da diversidade dos ecossistemas aquáticos e 70% da comunidade bentônica (Sandin, 2003; Briers & Biggs, 2003, Balian et al., 2008). Devido ao carácter inseticida do fipronil, após a contaminação dos tratamentos F e M, houve um desaparecimento dos insetos pertencentes às ordens Odonata e Diptera, especificamente das famílias Libellulidae e Chironomidae (subfamílias Tanypodinae e Chironominae), que apresentaram respostas inversas aos desvios significativos desses tratamentos na PRC. Este inseticida faz parte do grupo químico pirazol e age como um forte bloqueador da regulação de íons de cloro por meio dos receptores GABA (ácido aminobutírico) em insetos, agindo diretamente no sistema nervoso dos organismos expostos (Tomlin, 1994). Nesse sentido, atribui-se os efeitos observados nos mesocosmos F, assim como com uma alta influência na mistura com 2,4-D (M), à alta concentração desse inseticida. Como discutido anteriormente, as concentrações de fipronil medidas no início do experimento nesses tratamentos foram cerca de 10 vezes menores que os valores já detectados em ecossistemas aquáticos presentes em áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil, demonstrando os altos riscos para as comunidades autóctones presentes nesses ambientes. Ressalta-se que no Brasil, assim como em outras regiões tropicais e subtropicais, a aplicação de agrotóxicos pode ser intensificada no período chuvoso (verão), aumentando a taxa de carreamento desses compostos para os ambientes aquáticos, potencializando os riscos para as comunidades biológicas (Gripp et al., 2017; Taniwaki et al., 2017).

Ao relacionar os índices ecológicos com os parâmetros físico-químicos da água e concentração de agrotóxicos, foi verificada uma relação inversa entre a concentração de fipronil e a riqueza, diversidade e abundância de organismos da fauna de macroinvertebrados, reforçando os efeitos deletérios desse inseticida na comunidade de macroinvertebrados. Nesse mesmo sentido, já foram detectadas diferenças na riqueza de famílias e abundância da fauna de macroinvertebrados de sistemas experimentais simulando cultivos de arroz irrigado tratados com agrotóxicos, incluindo o fipronil,

comparados a sistemas que simularam a agricultura orgânica (não contaminados) (Rizo-Patrón et al., 2013).

Estudos ecotoxicológicos já demonstraram efeitos relacionados ao inseticida fipronil para indivíduos das famílias Libellulidae e Chironomidae em condições controladas de laboratório. Jinguji et al. (2012), por exemplo, observaram que larvas da espécie *Sympetrum infuscatum*, pertencente à família Libellulidae, foram sensíveis ao fipronil, cuja exposição a baixas concentrações (concentração inicial de $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$) provocou a mortalidade de todas as larvas após nove dias de experimento. Weston e Lydy (2014), ao avaliarem o impacto do fipronil em macroinvertebrados bentônicos, verificaram que a espécie *Chironomus dilutus* foi a mais sensível dentre as espécies avaliadas, com CL_{50} ao composto de $32,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Em um estudo em áreas de arroz irrigado no Brasil, foi verificado que o uso de fipronil no tratamento de sementes provocou uma redução na densidade de organismos da família Chironomidae, com uma maior sensibilidade de gêneros pertencentes à subfamília Tanypodinae (Marchiori; Baumart; Santos, 2012). Nessa mesma linha, outro estudo verificou o desaparecimento e gradual reaparecimento ao longo do tempo de organismos da família Chironomidae, com destaque à subfamília Chironominae, em unidades experimentais de arroz irrigado tratadas (tratamento de sementes) com diferentes doses de fipronil (Stevens; Helliwell; Warren, 1998). A dominância de quironomídeos na fauna de macroinvertebrados em ambientes dulcícolas tropicais varia entre 30 e 70% (Corbi and Trivinho-Strixino, 2008; Kleine et al., 2011; Saulino et al., 2014) e esse grupo pode contribuir com até 80% da produtividade secundária dos insetos nesses ambientes (Berg and Hellenthal, 1992), evidenciando que o desaparecimento e/ou diminuição da abundância de indivíduos dessa família implica em importantes perdas de funções ecossistêmicas, com efeitos indiretos dentro das cadeias tróficas.

Nos mesocosmos que receberam a mistura dos agrotóxicos (M), todos os organismos desapareceram, com exceção da subclasse Oligochaeta no T7 e T14. Esses efeitos foram mais pronunciados em comparação aos mesocosmos que receberam os agrotóxicos isolados e controle. Estudos já tem reportado e discutido que a mistura desses dois agrotóxicos causou efeitos deletérios mais severos do que quando os compostos agiram de forma isolada para organismos de diversos grupos taxonômicos (Moreira et al., 2020a; Moreira et al., 2020b; Silva et al., 2020; Freitas et al., 2022), com destaque para macroinvertebrados da família Chironomidae (Pinto et al. 2021b e c) e Hyallellidae (Pinto et al., 2021a). Esses resultados, somados às evidências reportadas no presente estudo,

demonstram que o uso concomitante do inseticida fipronil e do herbicida 2,4-D na agricultura convencional potencializa os riscos para a biota autóctone de ambientes aquáticos adjacentes aos campos agrícolas.

Nos tratamentos com D, F e M foi observado uma alta abundância de indivíduos da ordem Pulmonata e sub-classe Oligochaeta. Adultos pertencentes a ordem Pulmonata são tolerantes aos distúrbios ambientais (Goulart e Callisto, 2003). Da mesma forma, as oligoquetas são apontadas como resistentes às perturbações ambientais (Beyene et al., 2009; Hodgkinson; Jackson, 2005) e estão entre os grupos mais abundantes e diversos na água doce, possuindo uma notável capacidade de habitar ambientes com baixo teor de oxigênio (Wilzbach et al., 2018). Apesar disso, essa subclasse desapareceu nos tratamentos V e MV após a contaminação, reaparecendo apenas em MV após 150 dias, sendo o grupo mais afetado conforme a análise de PRC pela contaminação dos tratamentos com vinhaça. Nos tratamentos V e MV, houve uma acidificação da água e aumento da concentração de metais, fatores que podem ter contribuído para a redução e desaparecimento dos oligoquetas, pois, embora alguns metais sejam essenciais para o metabolismo desses organismos (Lukkari et al., 2005), dependendo da concentração podem provocar efeitos deletérios aos organismos (Cesar et al., 2011), ressaltando-se que a diminuição do pH pode potencializar esse processo (Kim et al., 2017). Em concordância com essas constatações, Botelho et al. (2012), verificaram que o ajuste do pH da vinhaça diminuiu sua toxicidade para duas espécies de cladóceros (*Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*) e para o peixe *Danio rerio*. Além disso, a mistura de diferentes metais pode contribuir para o desaparecimento desse grupo, tal como observado por Neto et al. (2018), que verificaram que a mistura de metais causou maior toxicidade (sinergismo) a diferentes espécies de oligoquetas.

Apesar das alterações significativas na qualidade da água em V e MV, nesses tratamentos foram observadas algumas famílias pertencentes a ordem Diptera, como Phoridae, Ephydriidae e Sciomyzidae, que não ocorreram nos outros tratamentos, incluindo controle. Na literatura, não foram encontrados trabalhos que estudaram os efeitos de vinhaça para essas famílias. A principal hipótese associada ao aparecimento desses grupos, que apresentam dispersão adulta aérea, foi o aumento da concentração de matéria orgânica na água, tanto pela aplicação direta da vinhaça, quanto pela morte das macrófitas presentes nos mesocosmos após a contaminação. Estudos já descreveram que a aplicação de vinhaça em campos agrícolas provoca uma atração e proliferação de moscas (Souza et al., 2021; Serra et al., 2017), reforçando nossa hipótese associada ao

aparecimento dessas famílias. O aumento na disponibilidade de presas, no tratamento contaminado pela vinhaça isolada, associado ao desaparecimento de grupos dominantes, como as oligoquetas, ajuda a explicar o aumento da abundância relativa de indivíduos da ordem Odonata. No entanto, no tratamento MV, devido a presença do inseticida, esse processo não foi evidenciado, seguindo a tendência das respostas observadas nos tratamentos F e M.

Parâmetros associados à poluição pela vinhaça, tais como a diminuição do oxigênio dissolvido e pH da água e aumento da concentração de nitrogênio e condutividade elétrica da água, foram relacionados aos índices ecológicos calculados para a comunidade de macroinvertebrados, sendo que esses efeitos, de diminuição e aumento dos parâmetros, foram associados ao empobrecimento da comunidade de macroinvertebrados. Devido à complexidade da composição química da vinhaça, é difícil estabelecer uma relação clara de quais parâmetros/compostos presentes nesse efluente industrial são os responsáveis pelas respostas nos organismos (Pinto et al., 2022). No entanto, percebe-se um efeito cumulativo entre aumento da carga orgânica e iônica e empobrecimento do meio (diminuição do pH e OD) na riqueza, abundância e diversidade de organismos, com desvios significativos em relação ao controle que persistiram até 75 dias após a contaminação.

4.3. MUDANÇAS NA DIVERSIDADE FUNCIONAL DA COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS

A classificação dos macroinvertebrados aquáticos em grupos funcionais alimentares é baseada nas suas características morfo-comportamentais que se relacionam diretamente ao modo que esses organismos obtêm e processam o alimento, tornando essa abordagem uma ferramenta importante na caracterização dos ecossistemas e dos impactos experimentados pelos mesmos (Cummins; Merritt; Andrade, 2005). Além dos efeitos diretos sobre os organismos, a poluição da água pode indiretamente alterar o tipo e/ou disponibilidade dos recursos alimentares, resultando na eliminação e/ou favorecimento de certos grupos funcionais, com consequentes reflexos na riqueza e diversidade funcional e equilíbrio das populações (Duan; Wang; Xu, 2011).

No tratamento controle, assim como nos demais mesocosmos antes da contaminação, foi possível observar uma quantidade expressiva de coletores-catadores, seguido de predadores e raspadores. A maior dominância de coletores-catadores ocorreu, principalmente, devido a presença de organismos da subfamília Chironominae e

subclasse Oligochaeta. Coletores-catadores são organismos que apresentam peças bucais modificadas para coletar matéria orgânica fina (0,05-1mm) e ultrafina (0,0005-0,05mm) que ficam acumuladas no fundo do corpo hídrico, sobre o sedimento ou outras regiões de depósito de matéria orgânica (Ramírez; Gutiérrez-Fonseca, 2014). Esse grupo de organismos, geralmente são abundantes em diversos tipos de ambientes, preservados e/ou perturbados, principalmente em corpos d'água lênticos ou regiões de depósito (remanso) em ambientes lóticos, onde normalmente ocorre uma maior deposição de matéria orgânica, apresentando um importante papel, tanto na ciclagem de matéria e energia, quanto na produtividade secundária dentro dos ambientes aquáticos (Berg and Hellenthal, 1992; Damanik-Ambarita et al., 2016, LI et al., 2013).

Oligochaeta e Chironominae incluem organismos tolerantes a altos níveis de poluição orgânica devido, principalmente, a características adaptativas morfológicas e fisiológicas que permitem que esses organismos sobrevivam, inclusive, em ambientes pobres em oxigênio (Statzner e Bêche, 2010). Entretanto, conforme descrito anteriormente, especificamente em T14 para os tratamentos V e MV, assim como T75 apenas para V, não foram observados a presença de nenhum organismo desses dois grupos, devido aos fatores já discutidos, implicando no desaparecimento dos coletores-catadores nesses mesocosmos.

Devido a diminuição/desaparecimento dos coletores-catadores nos tratamentos V e MV, houve um aumento da abundância relativa dos predadores e, em um menor grau, dos raspadores. Predadores são aqueles organismos que capturam e consomem presas vivas (Merritt & Cummins, 1996b), sendo representados nesses tratamentos pelas larvas da ordem Odonata. Larvas de Odonata desempenham um importante papel na dinâmica do ecossistema aquático (Costa et al., 2006), e são predadores relevantes na teia alimentar de água doce (Oliveira et al., 2013). Além do desaparecimento de outros grupos funcionais, outro fator associado ao aumento da abundância de predadores é o aumento da disponibilidade de presas pela proliferação de larvas de moscas das Phoridae, Ephydriidae e Sciomyzidae nos tratamentos contaminados pela vinhaça, uma vez que a dieta desses organismos inclui outros insetos aquáticos (Corbet, 1999; Furlan & Dos Anjos, 2015).

A eliminação dos insetos nos tratamentos contaminados pelo fipronil isolado e em mistura com o 2,4-D provocou, como consequência, no desaparecimento dos predadores. A diminuição e desaparecimento dos predadores podem ocasionar grandes alterações nas

funções ecossistêmicas de um ambiente, pois estes são responsáveis por mover a energia entre níveis tróficos e possuem potencial de controlar as populações de outros organismos (Oberndorfer, McArthur & Barnes, 1984; Cooper, Walde & Peckarsky, 1990). Por essa razão, o desaparecimento dos predadores pode explicar o aumento da abundância relativa dos coletores-catadores e raspadores.

Os organismos raspadores foram o terceiro grupo funcional mais predominante ao longo do experimento. Os raspadores desempenham os papéis tróficos de herbívoros, detritívoros e generalistas, uma vez que utilizam diversas estratégias de alimentação ao mesmo tempo ou durante diferentes fases da vida, raspando biofilmes, compostos por algas, bactérias, fungos, animais e detritos aderidos a diferentes substratos com compõem os diversos micro-habitats nos ambientes aquáticos (Rawer-Jost et al., 2000). Apesar de ter sido evidenciado aumento nos valores dos parâmetros de clorofila *a* e *b*, associados ao aumento na concentração de algas, nos tratamentos contendo vinhaça, os raspadores desapareceram nesses mesocosmos em alguns períodos. Nesse caso, um incremento na disponibilidade de recursos alimentares não refletiu, indiretamente, num favorecimento desse grupo funcional, provavelmente devido à alta toxicidade da vinhaça e sua mistura com agrotóxicos. A poluição orgânica, de uma maneira geral, implica num prejuízo para a fauna de raspadores, causando a diminuição e/ou desaparecimento desse grupo funcional (Duan; Wang; Xu, 2011; Helson e Williams, 2013). O desaparecimento dos raspadores pode desequilibrar o ecossistema aquático, pois por consumirem algas, esses indivíduos exercem um efeito importante no controle populacional dos produtores primários (Ramírez; Gutiérrez-Fonseca, 2014), no consumo de biomassa produtiva e exercem forte influência na composição de espécies de algas (Feminella & Hawkins, 1995).

Os filtro-coletores estiveram presentes somente no tratamento M em T150, sendo representados por organismos pertencentes a família Hydrophilidae da ordem Coleoptera. Buendia et al., 2013 identificaram essa ordem de organismos como sendo o grupo mais sensível, apresentando baixa ocorrência em seu estudo de gradiente de sedimentação em riachos. O baixo percentual desses grupos indica sensibilidade à degradação ambiental (Helson e Williams, 2013). Os filtro-coletores possuem adaptações bucais especiais, capturando partículas diretamente da coluna d'água (Ramírez; Gutiérrez-Fonseca, 2014), exercendo uma importante função ecossistêmica pela maior eficiência no uso desse tipo de recurso e ao remover (filtrar) partículas orgânicas da coluna d'água, reduzindo a taxa

de exportação de partículas para trechos à jusante, promovendo serviços de purificação da água e ciclagem de nutrientes (Wotton, Malmqvist, Muotka & Larsson, 1998).

As diminuições na riqueza e diversidade de grupos funcionais observada na mistura dos agrotóxicos reforça os riscos associado a ocorrência desses dois compostos em corpos d'água, tanto para a estrutura, quanto para o funcionamento desses ambientes, resultando em perdas os serviços ecossistêmicos. Além disso, devido ao limitado número de grupos funcionais encontrados, além da alta variabilidade observada entre os tratamentos e tempos, não foram detectadas diferenças estatísticas temporais na composição de coletores-catadores, predadores e raspadores. No entanto, ressalta-se que houve uma tendencia de alteração após a contaminação nos tratamentos F, M, V e MV, devido ao desaparecimento/alteração na abundância desses grupos ao longo do tempo, como discutido anteriormente, reforçando as implicações funcionais aos ecossistemas causadas por diferentes práticas de manejo agrícola, especialmente em áreas de cultivo de cana-de-açúcar.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo contribuiu para um melhor entendimento dos efeitos tóxicos e levanta preocupações como concentrações relevantes de campo dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D e da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada como fertirrigação exercem sobre as comunidades de macroinvertebrados aquáticos de forma realista através de modelos ecossistêmicos. Além disso, foi possível observar que esses efeitos são mais severos quando esses compostos ocorrem simultaneamente do meio ambiente.

Os principais efeitos identificados foram mudanças na composição e estrutura da comunidade, o já imaginado desaparecimento dos insetos na presença do fipronil, bem como a diminuição da subfamília Chirominae, fato que possivelmente reduziu a competição por recursos e conseqüentemente contribuiu para a aumento de Oligochaeta neste tratamento, e também a mistura de ambos os agrotóxicos fez com que todos os organismos desaparecessem em T7 e T14, exceto Oligochaeta. Além disso, as principais alterações nas características funcionais observadas foram em T14 para os tratamentos V e MV, e em T75 para V, os organismos coletores-coletores Oligochaeta e Chironominae considerados tolerantes a altos níveis de poluição orgânica não foram observados, e também o desaparecimento de insetos na presença de fipronil, que são classificados como predadores. Além disso, foram observados efeitos conseqüentes das alterações nas

características físico-químicas da água, devido à ação, principalmente da vinhaça, como alta carga poluente, atestado pelos altos valores de DBO e DQO, nutrientes, íons e teores metálicos, e também baixo pH.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAYABA, R. D. et al. Occurrence of pesticides in waters from the largest sugar cane plantation region in the world. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 9824–9835, 1 fev. 2021.
- AHAMEFULA, N. J. Impact of Hypoxia on the Community Structure of Benthic Macroinvertebrates of Lagos Lagoon, Nigeria. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 20, n. 1, p. 121–130, 9 maio 2016.
- ALLAN, J. DAVID. **Stream ecology : structure and function of running waters**. [s.l.] Chapman & Hall, 1996.
- Apha, 1995. Standard methods for examination water and wastewater. 19th ed. DC, Washington.
- Apha, 2018. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association. <https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.103>.
- BALIAN, E. V. et al. The Freshwater Animal Diversity Assessment: An overview of the results. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 627–637, 18 dez. 2008.
- BENKE, A. C.; BRUCE WALLACE, J. High secondary production in a Coastal Plain river is dominated by snag invertebrates and fuelled mainly by amorphous detritus. **Freshwater Biology**, v. 60, n. 2, p. 236–255, 1 fev. 2015.
- BENLI, A. Ç. K. et al. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 296–299, 1 jul. 2007.
- BERG, M. B.; HELLENTHAL, R. A. The role of Chironomidae in energy flow of a lotic ecosystem. **Netherland Journal of Aquatic Ecology**. 1992 26:2, v. 26, n. 2, p. 471–476, jun. 1992.
- BEYENE, A. et al. Comparative study of diatoms and macroinvertebrates as indicators of severe water pollution: Case study of the Kebena and Akaki rivers in Addis Ababa, Ethiopia. **Ecological Indicators**, v. 9, n. 2, p. 381–392, 1 mar. 2009.
- BOTELHO, R. G. et al. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.738516>, v. 94, n. 10, p. 2035–2045, dez. 2012.
- BRIERS, R. A.; BIGGS, J. Indicator taxa for the conservation of pond invertebrate diversity. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 13, n. 4, p. 323–330, jul. 2003.
- BROVINI, E. M. et al. Three-best-seller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. 144754, 1 jun. 2021.
- BROWNE, P. et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. **Neurology**, v. 83, n. 11, p. 1022–1024, 9 set. 2014.

- BUENDIA, C. et al. Reach and catchment-scale influences on invertebrate assemblages in a river with naturally high fine sediment loads. **Limnologia**, v. 43, n. 5, p. 362–370, 1 set. 2013.
- CARVALHO, A. L.; NESSIMIAN, J. L. Odonata do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: habitats e hábitos das larvas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 05, n. 01, p. 3–28, 1998.
- CASPERS, H. F. J. H. Mackereth, J. Heron & J. F. Talling: Water Analysis: Some Revised Methods for Limnologists. – With 4 fig., 120 pp. Far Sawrey, Ambleside: Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 36. 1978. ISBN 900386 31 2. £ 2. 50. **Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie**, v. 64, n. 4, p. 456–456, 1 jan. 1979.
- CASTILHOS, Z. C. et al. Metodologia para monitoramento da qualidade das águas da bacia carbonífera sul catarinense: ferramenta para gestão em poluição ambiental. 2010.
- CESAR, R. et al. Mercury, copper and zinc contamination in soils and fluvial sediments from an abandoned gold mining area in southern Minas Gerais State, Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 64, n. 1, p. 211–222, 17 nov. 2011.
- CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo 2017**. São Paulo: [s.n.]. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2018/06/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-das-%C3%81guas-Interiores-no-Estado-de-S%C3%A3o-Paulo-2017.pdf>>. Acesso em: 7 nov. 2022.
- CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 1 dez. 2013.
- CUMMINS, K. W. Hynes, H. B. N. 1970. **The ecology of running waters**. Univ. Toronto Press, xxiv + 555 p. \$25.00. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 1971. v. 16
- CUMMINS, K. W.; MERRITT, R. W.; ANDRADE, P. C. N. The use of invertebrate functional groups to characterize ecosystem attributes in selected streams and rivers in south Brazil. <http://dx.doi.org/10.1080/01650520400025720>, v. 40, n. 1, p. 69–89, abr. 2007.
- DA SILVA SOUZA, T. et al. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 2, p. 1627–1636, 15 fev. 2013a.
- DA SILVA SOUZA, T. et al. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 2, p. 1627–1636, 15 fev. 2013b.
- DAMANIK-AMBARITA, M. N. et al. Ecological water quality analysis of the Guayas river basin (Ecuador) based on macroinvertebrates indices. **Limnologia**, v. 57, p. 27–59, 1 mar. 2016.
- DAVE, M.; GOULART, C. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental 1. **FAPAM**, 2003.

DE CASTRO-CATALÀ, N. et al. Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools. **Science of The Total Environment**, v. 540, p. 297–306, 1 jan. 2016.

DE OLIVEIRA, B. G. et al. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, v. 200–201, p. 77–84, 1 jun. 2013.

DOTANIYA, M. L. et al. Use of sugarcane industrial by-products for improving sugarcane productivity and soil health. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 185–194, 1 set. 2016.

DUAN, X. HUA; WANG, Z. Y.; XU, M. ZHEN. Effects of fluvial processes and human activities on stream macro-invertebrates. **International Journal of Sediment Research**, v. 26, n. 4, p. 416–430, 1 dez. 2011.

ENSMINGER, I.; YAO-YUN CHANG, C.; BRÄUTIGAM, K. Tree Responses to Environmental Cues. Em: **Advances in Botanical Research**. [s.l.] Academic Press, 2015. v. 74p. 229–263.

ESPAÑA-GAMBOA, E. I. et al. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, 2012.

FEMINELLA, J. W.; HAWKINS, C. P. Interactions between Stream Herbivores and Periphyton: A Quantitative Analysis of past Experiments. <https://doi.org/10.2307/1467536>, v. 14, n. 4, p. 465–509, 1995.

FREITAS, J. S. et al. Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109446, 30 out. 2019.

GAZONATO NETO, A. J. et al. Freshwater neotropical oligochaetes as native test species for the toxicity evaluation of cadmium, mercury and their mixtures. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 2, p. 133–142, 15 mar. 2019.

GOULART, B. V. et al. Matrix effect challenges to quantify 2,4-D and fipronil in aquatic systems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 12, p. 1–12, 1 dez. 2020.

Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater in agriculture and aquaculture. [s.l.: s.n.].

GUNKEL, G. et al. Sugar cane industry as a source of water pollution - Case study on the situation in Ipojuca river, Pernambuco, Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 180, n. 1–4, p. 261–269, 28 out. 2007.

HARRAHY, E. A.; EDWARDS, D. S.; HEDMAN, C. J. Persistence of 2,4-D and its effects on benthic macroinvertebrates following spring treatment of eurasian watermilfoil, *Myriophyllum spicatum* L. in two lakes in southeastern wisconsin, USA. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, n. 4, p. 404–409, 24 jan. 2014.

- HERMAN, M. R.; NEJADHASHEMI, A. P. A review of macroinvertebrate- and fish-based stream health indices. **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 15, n. 2, p. 53–67, 1 jun. 2015.
- HODKINSON, I. D.; JACKSON, J. K. Terrestrial and aquatic invertebrates as bioindicators for environmental monitoring, with particular reference to mountain ecosystems. **Environmental Management**, v. 35, n. 5, p. 649–666, 17 maio 2005.
- ISLAM, F. et al. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, p. 332–351, 1 fev. 2018.
- JELVEZ SERRA, N. S. et al. Identification of stable fly attractant compounds in vinasse, a byproduct of sugarcane–ethanol distillation. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, n. 4, p. 381–391, 1 dez. 2017.
- JINGUJI, H. et al. Effect of imidacloprid and fipronil pesticide application on *Sympetrum infuscatum* (Libellulidae: Odonata) larvae and adults. **Paddy and Water Environment**, v. 11, n. 1–4, p. 277–284, 1 jan. 2013.
- KARP, S. G. et al. Sugarcane: A Promising Source of Green Carbon in the Circular Bioeconomy. **Sugar Tech**, v. 24, n. 4, p. 1230–1245, 1 ago. 2022.
- KIM, H. et al. Water harvesting from air with metal-organic frameworks powered by natural sunlight. **Science**, v. 356, n. 6336, p. 430–434, 28 abr. 2017.
- KOMINKO, H.; GORAZDA, K.; WZOREK, Z. Effect of sewage sludge-based fertilizers on biomass growth and heavy metal accumulation in plants. **Journal of Environmental Management**, v. 305, p. 114417, 1 mar. 2022.
- Koroleff, F. (1976) Determination of Nutrients. In Grasshof, E. and Kremling, E., Eds., *Methods the Seawater Analysis*, Verlag Chemie Weinheim, New York. - References - Scientific Research Publishing. Disponível em: <<https://scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2035200>>. Acesso em: 8 nov. 2022.
- LOCK, M. A. et al. River Epilithon: Toward a Structural-Functional Model. **Oikos**, v. 42, n. 1, p. 10, jan. 1984.
- LUKKARI, T. et al. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. **Applied Soil Ecology**, v. 30, n. 2, p. 133–146, 1 out. 2005.
- Magurran, A.E. (2004) *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, Oxford, 256 p. - References - Scientific Research Publishing. [s.l: s.n.], 2004.
- MANSANO, A. S. et al. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 312–321, 1 ago. 2017.
- MARCHIORI, A.; BAUMART, J.; SANTOS, S. Immatures of Chironomidae (Insecta – Diptera) under the action of pesticides in irrigated rice field. **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 12, n. 1, p. 43–52, 1 jan. 2012.

MAUL, J. D. et al. Effect of sediment-associated pyrethroids, fipronil, and metabolites on *Chironomus tentans* growth rate, body mass, condition index, immobilization, and survival. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2582–2590, dez. 2008.

MCCAFFERTY, W. P. **Aquatic Entomology - The Fishermen s Guide and Ecologists Illustrated Guide to Insects and Their Relatives (Crosscurrents) PDF.pdf**. [s.l: s.n.], 1981.

MORAIS, G. DOS S. Efeitos genotóxicos e biológicos em *Chironomus sancticaroli* (Strixino & Strixino, 1981) causados pela exposição ao fenantreno. 2014.

MOREIRA, R. A. Efeitos dos agrotóxicos Kraft® 36 EC (abamectina) e Score® 250 EC (difenoconazol), isolados e em misturas, sobre organismos zooplancônicos. [s.l: s.n.], 2017.

MOREIRA, R. A. et al. Exposure to environmental concentrations of fipronil and 2,4-D mixtures causes physiological, morphological and biochemical changes in *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111180, 15 dez. 2020b.

MOREIRA, R. A. et al. 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, 1 out. 2020a.

NUNES FERRAZ JUNIOR, A. D. et al. Advancing anaerobic digestion of sugarcane vinasse: Current development, struggles and future trends on production and end-uses of biogas in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 157, p. 112045, 1 abr. 2022.

NUNES, N. S. P. et al. Clarification of sugarcane (*Saccharum officinarum*) vinasse for microalgae cultivation. **Bioresource Technology Reports**, v. 19, p. 101125, 1 set. 2022.

OBERNDORFER, R. Y. et al. The Effect of Invertebrate Predators on Leaf Litter Processing in an Alpine Stream. **Ecology**, v. 65, n. 4, p. 1325–1331, 1 ago. 1984.

OGURA, A. P. et al. An overview of the sugarcane expansion in the state of São Paulo (Brazil) over the last two decades and its environmental impacts. **Sustainable Production and Consumption**, v. 32, p. 66–75, 1 jul. 2022.

ORTEGÓN, G. P. et al. Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). **Science of The Total Environment**, v. 539, p. 410–419, 1 jan. 2016.

PALACIOS-BERECHE, M. C. et al. Brazilian sugar cane industry – A survey on future improvements in the process energy management. **Energy**, v. 259, p. 124903, 15 nov. 2022.

PARK, K. et al. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). **Comparative**

Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, v. 151, n. 4, p. 439–446, 2010.

PEDRO ESCHER, J. Mutagenic Action of Sugarcane Vinasse in the Tradescantia Pallida Test System. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v. 04, n. 02, 2014.

PIACENTE, F. J. Agroindústria canavieira e o sistema de gestão ambiental : o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá. [s.l: s.n.], 1976.

PIELOU, E. C. **Population and community ecology : principles and methods**. [s.l.] Gordon and Breach, 1974.

PIFFER, M. A. et al. Sulfate- and pH-driven metabolic flexibility in sugarcane vinasse dark fermentation stimulates biohydrogen evolution, sulfidogenesis or homoacetogenesis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 73, p. 31202–31222, 26 ago. 2022.

PINTO, T. J. DA S. et al. Functional responses of *Hyalella meinerti* after exposure to environmentally realistic concentrations of 2,4-D, fipronil, and vinasse (individually and in mixture). **Aquatic Toxicology**, v. 231, p. 105712, 1 fev. 2021b.

PINTO, T. J. DA S. et al. Impact of 2,4-D and fipronil on the tropical midge *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, p. 111778, 1 fev. 2021a.

PINTO, T. J. DA S. et al. 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, 15 ago. 2021c.

PINTO, T. J. DA S. et al. 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, 20 jan. 2023.

PORTRUNELI, N. **Efeito da exposição aguda do inseticida Fipronil e do herbicida 2,4-D e mistura de ambos em curimatá, Prochilodus lineatus (Teleosteo, Prochilodontidae)**. [s.l: s.n.], 2020.

QUADRA, G. R. et al. Temporal and Spatial Variability of Micropollutants in a Brazilian Urban River. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 142–154, 1 jul. 2021.

RAMÍREZ, A. et al. Functional feeding groups of aquatic insect families in Latin America: a critical analysis and review of existing literature. **Revista de Biología Tropical**, v. 62, n. S2, p. 155–167, 1 abr. 2014.

RAWER-JOST, C. et al. Macroinvertebrate functional feeding group methods in ecological assessment. **Hydrobiologia** 2000 422:0, v. 422, n. 0, p. 225–232, 2000.

RIZO-PATRÓN V., F. et al. Macroinvertebrate communities as bioindicators of water quality in conventional and organic irrigated rice fields in Guanacaste, Costa Rica. **Ecological Indicators**, v. 29, p. 68–78, 1 jun. 2013.

- ROMANHOLO FERREIRA, L. F. et al. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132–137, 1 jan. 2011.
- SANCHES, A. L. M. et al. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, p. 582–587, 1 dez. 2017a.
- SANDIN, L. Benthic macroinvertebrates in Swedish streams: community structure, taxon richness, and environmental relations. **Ecography**, v. 26, n. 3, p. 269–282, 1 jun. 2003.
- SAULINO, H. H. L.; CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Aquatic insect community structure under the influence of small dams in a stream of the Mogi-Guaçu river basin, state of São Paulo. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 1, p. 79–88, 2014.
- SCHLENK, D. et al. Toxicity of Fipronil and Its Degradation Products to *Procambarus* sp.: Field and Laboratory Studies. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 2001 41:3, v. 41, n. 3, p. 325–332, 2001.
- SERRANO BALDERAS, E. C. et al. Potential application of macroinvertebrates indices in bioassessment of Mexican streams. **Ecological Indicators**, v. 61, p. 558–567, 1 fev. 2016.
- SILBERSCHMIDT FREITAS, J. et al. Realistic exposure to fipronil, 2,4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. **Environmental Pollution**, v. 299, p. 118894, 15 abr. 2022.
- SILVA, L. C. M. et al. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 9, p. 1462–1475, 1 nov. 2020.
- SOUZA, T. F.; CANÇADO, P. H. D.; BARROS, A. T. M. Attractivity of vinasse spraying to stable flies, *Stomoxys calcitrans* in a sugarcane area. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, 23 jul. 2021.
- SRIVASTAVA, S.; JAIN, R. Effect of distillery spent wash on cytomorphological behaviour of sugarcane seedlings. **Journal of Environmental Biology**, v. 31, n. 5 Supplement, p. 809–812, 2010.
- STATZNER, B.; BÊCHE, L. A. Can biological invertebrate traits resolve effects of multiple stressors on running water ecosystems? **Freshwater Biology**, v. 55, n. SUPPL. 1, p. 80–119, jan. 2010.
- STEHLE, S. et al. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. **PNAS**, v. 112, n. 18, p. 5750–5755, 5 maio 2015a.
- STEHLE, S. et al. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. **PNAS**, v. 112, n. 18, p. 5750–5755, 5 maio 2015b.
- STEPHENSON, M.; MACKIE, G. L. A laboratory study of the effects of waterborne cadmium, calcium, and carbonate concentrations on cadmium concentrations in *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda). **Aquatic Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 53–62, 1 jul. 1989.

STEVENS, M. M.; HELLIWELL, S.; WARREN, G. N. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crops Research**, v. 57, n. 2, p. 195–207, 29 maio 1998.

TANIWAKI, R. H. et al. Climate change and multiple stressors in small tropical streams. **Hydrobiologia** 2016 **793:1**, v. 793, n. 1, p. 41–53, 8 jul. 2016.

TÉCNICO, A. et al. Estudo do potencial de formação de trihalometanos na lagoa de Extremoz (RN). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 2, p. 315–322, 17 abr. 2020.

TSABOULA, A. et al. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. **Environment International**, v. 91, p. 78–93, 1 maio 2016.

VAN DE MEUTTER, F.; STOKS, R.; DE MEESTER, L. The effect of turbidity state and microhabitat on macroinvertebrate assemblages: a pilot study of six shallow lakes. **Aquatic Biodiversity II**, p. 379–390, 2005.

VAN DEN BRINK, P. J.; BRAAK, C. J. F. TER. Principal response curves: Analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 138–148, 1 fev. 1999.

VIANA, N. P. et al. Bioconcentration and toxicological impacts of fipronil and 2,4-D commercial formulations (single and in mixture) in the tropical fish, *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 8, p. 11685–11698, 1 fev. 2022.

Wallace, J.B., and N.H. Anderson. 1995. Habitat, life history, and behavioral adaptations of aquatic insects, pp. 41-73. In Merritt, R.W., and K.W. Cummins (eds.), *An Introduction to the Aquatic Insects of North America*, 3rd ed. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa. [s.d.].

WESTON, D. P.; LYDY, M. J. Toxicity of the insecticide fipronil and its degradates to benthic macroinvertebrates of urban streams. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 1290–1297, 21 jan. 2014.

WILLIS, G. H.; MCDOWELL, L. L. Pesticides in agricultural runoff and their effects on downstream water quality. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 267–279, 1 nov. 1982.

WILZBACH, M. A. et al. Channel—floodplain coupling in the Kissimmee River, Florida (USA): invertebrate movement and fish feeding. **SIL Proceedings, 1922-2010**, v. 28, n. 1, p. 164–172, fev. 2002.

WILZBACH, M. A.; CUMMINS, K. W. Rivers and Streams: Physical Setting and Adapted Biota. **Encyclopedia of Ecology**, p. 594–606, 1 jan. 2019.

WOTTON, R. S. et al. Fecal pellets from a dense aggregation of suspension-feeders in a stream: An example of ecosystem engineering. **Limnology and Oceanography**, v. 43, n. 4, p. 719–725, 1 jun. 1998.

APÊNDICE A

Table S1: Número médio de famílias de macroinvertebrados bentônicos nos mesocosmos controle (C), 2,4-D (D) e fipronil ao longo do tempo de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação. A classificação dos Grupos de Alimentação Funcional (GFA) foi separada em coletores-coletores (CC), filtradores (F), filtros-coletores (FC), raspadores (Rs), trituradores (Tr) e predadores (Pr).

Ordem	Família	GFA	C								D								F								
			T-7	T-1	T1	T7	T14	T21	T75	T150	T-7	T-1	T1	T7	T14	T21	T75	T150	T-7	T-1	T1	T7	T14	T21	T75	T150	
Odonata	Libellulidae	Pr	2	1	4	1	2	2	5	4	-	1	-	2	3	-	2	4	1	-	2	-	-	-	-	-	
	Coenagrionidae	Pr	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pulmonata	Planorbidae	Rs	7	6	3	2	9	8	23	8	-	-	1	1	2	1	34	1	-	12	9	3	6	14	22	2	
	Phoridae	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ephydriidae	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Diptera	Sciomyzidae	Pr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tabanidae	Pr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Muscidae	Pr	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Culicidae	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ceratopogonidae	Pr	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Chironominae	CC	145	34	25	12	-	2	25	107	27	-	3	12	3	8	41	39	13	17	-	-	-	-	8	154	
	Tanypodinae	Pr	13	8	-	11	2	1	-	1	3	-	4	2	-	-	-	1	7	1	-	-	-	-	-	-	
	Orthoclaadiinae	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Hydrophilidae	FC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Coleoptera	Haliplidae	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ephemeroptera	Dryopidae	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Leptophlebiidae	CC	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Caenidade	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Basommatophora	Physidae	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hemiptera	Corixidae	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Belostomatidae	Pr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1		
	Oligochaeta*	CC	2	7	7	12	77	68	79	234	14	3	26	29	62	9	35	55	3	-	22	14	7	69	17	11	

*A classificação Oligochaetata no nível de subclasse. ** Classificação de Alimentos Funcionais não identificada por Grupo de Alimentos Funcionais.

Table S1: Número médio de famílias de macroinvertebrados bentônicos nos mesocosmos controle (C), 2,4-D (D) e fipronil ao longo do tempo de 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação. A classificação dos Grupos de Alimentação Funcional (GFA) foi separada em coletores-coletores (CC), filtradores (F), filtros-coletores (FC), raspadores (Rs), trituradores (Tr) e predadores (Pr). (continuação).

Ordem	Família	GFA	V								M								MV							
			T-7	T-1	T1	T7	T14	T21	T75	T150	T-7	T-1	T1	T7	T14	T21	T75	T150	T-7	T-1	T1	T7	T14	T21	T75	T150
Odonata	Libellulidae	Pr	-	-	-	4	3	4	1	-	2	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	2	-	-	-
	Coenagrionidae	Pr	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Pulmonata	Planorbidae	Rs	2	2	1	2	-	-	-	2	-	-	-	-	13	127	5	9	6	4	-	1	-	-	14	
	Phoridae	**	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	
	Ephydriidae	**	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1-	-	-	
	Sciomyzidae	Pr	-	-	-	-	1	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	-	-	
	Tabanidae	Pr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	Diptera	Muscidae	Pr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Culicidae	CC	-	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Coleoptera	Ceratopogonidae	Pr	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	
	Chironominae	CC	61	26	9	3	-	1	-	11	18	27	2	-	-	-	7	89	94	77	24	5	-	-	38	14
	Tanypodinae	Pr	12	1	3	-	-	-	-	-	5	1	2	-	-	-	-	-	7	11	2	1	-	-	-	1
	Orthoclaadiinae	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-
	Hydrophilidae	FC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	Haliplidae	**	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dryopidae	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ephemeroptera	Leptophlebiidae	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Caenidade	CC	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Basommatophora	Physidae	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	
Hemiptera	Corixidae	Rs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	
	Belostomatidae	Pr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Oligochaeta*	CC	3	2-	-	-	-	-	-	-	7	1	28	1-	1-	58	14-	81	3	4	3	3	-	-	-	3

*A classificação Oligochaetata no nível de subclasse. ** Classificação de Alimentos Funcionais não identificada por Grupo de Alimentos Funcionais.

Table S2: Caracterização físico-química da vinhaça pura adaptada de Pinto et al (2021).

Parâmetros	Concentrações
pH	3,91
Condutividade elétrica (mS cm ⁻¹)	8,42
Demanda biológica de oxigênio - DBO (mg L ⁻¹)	46,500
Demanda química de oxigênio - DQO (mg L ⁻¹)	107,000
Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	3,500
Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	639
Fósforo total (mg L ⁻¹)	150
Amônia (mg L ⁻¹)	53
Cromo - Cr (mg L ⁻¹)	0,207
Cobre - Cu (mg L ⁻¹)	3
Chumbo - Pb (mg L ⁻¹)	0,340
Manganês -Mn (mg L ⁻¹)	6,24
Ferro - Fe (mg L ⁻¹)	247
Níquel - Ni (mg L ⁻¹)	0,183
Cádmio - Cd (mg L ⁻¹)	0,025
Zinco - Zn (mg L ⁻¹)	1,23
Cobalto - Co (mg L ⁻¹)	0,219
Lítio - Li (mg L ⁻¹)	0,031
Magnésio - Mg (mgL ⁻¹)	391
Antimônio - Sb (mg L ⁻¹)	0,530
Alumínio - Al (mg L ⁻¹)	500
Bário - Ba (mg L ⁻¹)	2
Cálcio - Ca (mg L ⁻¹)	1,140
Sódio - Na (mg L ⁻¹)	60
Potássio - K (mg L ⁻¹)	3,360

Fonte: adaptado de Pinto et al. (2021).

Table S3: Média das variáveis ambientais das amostras dos tratamentos dos mesocosmos de controle (C), 2,4-D (D), fipronil (F), mistura de defensivos (M), vinhaça (V) e mistura de defensivos com vinhaça (MV) ao longo do tempo, 7 dias (T-7) e 1 dia (T-1) antes da contaminação e 1 (T1), 7 (T7), 14 (T14), 28 (T28), 75 (T75) e 150 (T150) dias após a contaminação.

	C								D								T150
	T-7	T-1	T1	T7	T14	T28	T75	T150	T-7	T-1	T1	T7	T14	T28	T75		
Temperatura (°C)	23,66 ± 0,2	23,16 ± 0,3	21,14 ± 0,6	22,12 ± 0,3	21,10 ± 0,5	23,38 ± 0,3	21,48 ± 0,1	22,20	23,60 ± 0,2	23,10 ± 0,4	20,93 ± 0,7	21,97 ± 0,6	20,87 ± 0,6	23,30 ± 0,4	21,43 ± 0,3	0,00	
pH	5,56 ± 0,1	6,21 ± 0,3	5,99 ± 0,1	5,86 ± 0,2	6,14 ± 0,2	6,36 ± 0,1	6,66 ± 0,1	6,40	5,51 ± 0,2	6,00 ± 0,05	5,95 ± 0,2	5,87 ± 0,2	5,96 ± 0,2	6,38 ± 0,1	6,63 ± 0,0	0,00	
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	10,98 ± 1,8	25,80 ± 2,9	26,66 ± 3,0	30,82 ± 5,0	31,36 ± 7,0	34,32 ± 6,5	42,98 ± 9,7	48,70	11,53 ± 2,1	26,53 ± 5,0	30,87 ± 7,8	34,93 ± 5,0	38,73 ± 5,4	46,13 ± 6,0	51,47 ± 11,6	0,00	
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	3,86 ± 0,4	4,52 ± 1,0	2,52 ± 0,7	1,70 ± 0,4	4,00 ± 0,4	2,01 ± 1,1	1,94 ± 1,1	4,54	3,99 ± 0,9	4,71 ± 0,2	3,02 ± 0,9	1,64 ± 0,7	2,05 ± 0,6	1,07 ± 0,6	1,29 ± 0,5	0,00	
Oxigênio dissolvido saturado (%)	45,78 ± 5,6	51,56 ± 12,0	27,92 ± 8,0	19,26 ± 5,0	28,98 ± 4,4	21,82 ± 12,7	21,80 ± 13,0	51,10	46,80 ± 10,2	54,33 ± 2,3	31,37 ± 10,7	18,83 ± 8,5	22,67 ± 6,3	11,73 ± 7,0	14,60 ± 5,7	0,00	
Turbidez (mg L ⁻¹)	2,57 ± 1,5	2,50 ± 0,7	2,96 ± 1,2	23,20 ± 8,5	25,20 ± 15,9	6,65 ± 5,3	17,62 ± 8,8	37,18	2,97 ± 0,9	3,82 ± 2,0	5,21 ± 4,5	26,67 ± 13,6	31,67 ± 18,0	6,85 ± 5,7	12,14 ± 2,2	0,00	
Clorofila <i>a</i> (µg L ⁻¹)	2,50 ± 2,4	2,85 ± 2,4	15,03 ± 8,0	4,10 ± 4,0	8,02 ± 9,5	15,03 ± 10,1	30,22 ± 44,5	87,62	3,96 ± 3,5	6,57 ± 5,3	16,00 ± 7,0	22,55 ± 24,3	13,56 ± 11,2	16,00 ± 5,7	30,68 ± 26,5	0,00	
Clorofila <i>b</i> (µg L ⁻¹)	4,97 ± 2,2	3,85 ± 2,0	28,60 ± 16,7	5,02 ± 6,3	13,13 ± 18,7	28,60 ± 20,3	47,30 ± 76,0	185,5	9,95 ± 7,7	10,79 ± 9,0	27,09 ± 18,1	31,01 ± 29,2	28,26 ± 24,7	27,09 ± 18,1	33,94 ± 25,7	0,00	
Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)		14,00 ± 3,7	16,40 ± 1,7	13,60 ± 1,1	13,20 ± 3,0	16,40 ± 2,0	22,00 ± 7,3	18,00		13,00 ± 6,5	18,67 ± 2,3	14,00 ± 0,0	14,67 ± 3,0	18,67 ± 2,3	18,67 ± 7,5	0,00	
Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	0,50 ± 0,1		1,04 ± 0,7	1,54 ± 0,5	0,51 ± 0,5	1,04 ± 0,8	1,31 ± 0,9	0,63 ± 0,4	0,96 ± 0,1		1,21 ± 0,3	0,96 ± 0,1	1,26 ± 0,7	1,21 ± 0,4	1,52 ± 0,8	0,86 ± 0,3	
Fósforo total (µg L ⁻¹)	90,05 ± 32,4		323,20 ± 434,2	150,7 ± 4	151,14 ± 43,9	323,2 ± 0	96,30 ± 75,8	107,2 ± 46,3	148,1 ± 36,1		158,3 ± 2	150,98 ± 71,1	193,15 ± 36,3	158,3 ± 2	130,6 ± 4	93,5 ± 8	

Nitrito ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$3,09 \pm 0,7$	$1,97 \pm 0,3$	$3,50 \pm 1,2$	$3,19 \pm 0,2$	$1,97 \pm 1,0$	$1,70 \pm 0,4$	$4,57 \pm 6,6$	$5,09 \pm 2,8$	$2,87 \pm 1,1$	$4,39 \pm 1,4$	$3,95 \pm 1,5$	$2,87 \pm 1,1$	$3,54 \pm 28,8$	$3,61 \pm 2,1$			
Fósforo inorgânico ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$3,48 \pm 2,1$	$98,05 \pm 4,9$	$43,31 \pm 57,1$	$7,72 \pm 1,8$	$98,05 \pm 58,6$	$32,78 \pm 42,2$	$35,57 \pm 27,4$	$14,57 \pm 11,8$	$9,90 \pm 2,1$	$37,18 \pm 38,0$	$8,86 \pm 1,2$	$9,90 \pm 2,1$	$28,81 \pm 13,0$	$33,4 \pm 8 \pm 15,0$			
Fosfato total dissolvido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$15,56 \pm 3,5$	$115,22 \pm 3,7$	$31,12 \pm 5,7$	$41,77 \pm 6,2$	$115,2 \pm 65,0$	$290,94 \pm 581,0$	$48,11 \pm 29,8$	$26,14 \pm 14,8$	$29,10 \pm 4,0$	$24,55 \pm 3,6$	$51,01 \pm 3,1$	$29,10 \pm 4,0$	$45,09 \pm 13,0$	$52,5 \pm 7 \pm 29,3$			
Nitrato ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$41,88 \pm 11,4$	$25,37 \pm 8,8$	$34,36 \pm 56,2$	$32,94 \pm 10,5$	$25,37 \pm 18,2$	$24,79 \pm 4,0$	$53,37 \pm 37,1$	$40,80 \pm 10,2$	$41,98 \pm 8,7$	$33,72 \pm 21,6$	$38,50 \pm 12,1$	$41,98 \pm 8,7$	$22,50 \pm 2,6$	$29,0 \pm 8 \pm 14,0$			
Silicato (mg L^{-1})	$1,19 \pm 0,7$	$2,61 \pm 1,1$	$86,39 \pm 99,4$	$4,24 \pm 2,1$	$2,61 \pm 2,0$	$2,59 \pm 0,6$	$4,95 \pm 7,1$	$1,53 \pm 0,2$	$2,73 \pm 0,4$	$70,60 \pm 21,3$	$4,82 \pm 0,4$	$2,73 \pm 0,4$	$2,98 \pm 0,3$	$1,76 \pm 0,6$			
Amônia ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$40,99 \pm 27,4$	$78,95 \pm 26,3$	$2,56 \pm 0,4$	$36,83 \pm 40,9$	$78,95 \pm 56,3$	$82,68 \pm 77,4$	$135,7 \pm 79,3$	$28,67 \pm 6,2$	$60,64 \pm 13,6$	$3,29 \pm 1,0$	$8,81 \pm 2,3$	$60,64 \pm 13,6$	$27,54 \pm 15,7$	$57,7 \pm 6 \pm 38,0$			
		F							M								
		T-7	T-1	T1	T7	T14	T28	T75	T150	T-7	T-1	T1	T7	T14	T28	T75	T150
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$23,50 \pm 0,1$	$23,53 \pm 0,6$	$21,10 \pm 0,6$	$21,87 \pm 0,1$	$20,80 \pm 0,2$	$23,13 \pm 0,1$	$21,27 \pm 0,1$	$0,00$	$23,43 \pm 0,3$	$22,53 \pm 0,4$	$20,93 \pm 0,2$	$21,97 \pm 0,4$	$20,80 \pm 0,3$	$23,20 \pm 0,0$	$21,53 \pm 0,1$	$0,00$	
pH	$5,65 \pm 0,3$	$6,15 \pm 0,6$	$6,09 \pm 0,2$	$5,84 \pm 0,4$	$6,04 \pm 0,3$	$6,17 \pm 0,1$	$6,84 \pm 0,2$	$0,00$	$5,63 \pm 0,3$	$6,07 \pm 0,2$	$6,05 \pm 0,1$	$5,97 \pm 0,2$	$5,97 \pm 0,3$	$6,44 \pm 0,2$	$6,91 \pm 0,1$	$0,00$	
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	$13,97 \pm 4,2$	$30,67 \pm 4,8$	$27,96 \pm 26,1$	$33,50 \pm 5,0$	$34,33 \pm 7,0$	$42,13 \pm 17,3$	$34,63 \pm 30,0$	$0,00$	$17,19 \pm 8,7$	$33,33 \pm 12,0$	$34,30 \pm 10,2$	$41,83 \pm 12,5$	$46,37 \pm 14,1$	$59,15 \pm 20,3$	$76,60 \pm 20,4$	$0,00$	
Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	$3,97 \pm 1,2$	$5,00 \pm 2,1$	$4,82 \pm 1,3$	$2,07 \pm 1,8$	$2,32 \pm 1,8$	$2,38 \pm 1,6$	$3,59 \pm 1,1$	$0,00$	$3,83 \pm 0,2$	$3,08 \pm 0,7$	$3,77 \pm 0,6$	$1,09 \pm 0,9$	$1,24 \pm 0,6$	$1,33 \pm 0,7$	$4,74 \pm 0,5$	$0,00$	
Oxigênio dissolvido saturado (%)	$46,43 \pm 14,1$	$58,77 \pm 23,0$	$50,63 \pm 12,4$	$23,30 \pm 20,5$	$25,43 \pm 20,0$	$26,73 \pm 20,2$	$51,27 \pm 27,2$	$0,00$	$44,53 \pm 3,0$	$35,67 \pm 7,4$	$39,73 \pm 7,1$	$12,20 \pm 11,7$	$13,43 \pm 0,6$	$14,57 \pm 7,8$	$53,60 \pm 6,2$	$0,00$	

Turbidez (mg L ⁻¹)	3,85 ± 2,3	3,68 ± 3,1	5,58 ± 3,6	30,00 ± 4,3	26,33 ± 1,5	6,16 ± 2,0	30,82 ± 5,0	0,00	1,83 ± 0,5	6,22 ± 7,1	6,17 ± 3,0	25,00 ± 4,6	26,00 ± 13,1	7,60 ± 3,0	25,94 ± 12,3	0,00
Clorofila <i>a</i> (µg L ⁻¹)	5,71 ± 4,9	5,00 ± 4,3	26,89 ± 10,0	7,03 ± 4,7	7,57 ± 1,8	26,89 ± 20,2	44,18 ± 3,0	0,00	0,54 ± 0,3	6,48 ± 6,5	20,65 ± 19,0	5,49 ± 0,8	5,63 ± 3,2	20,65 ± 19,0	39,31 ± 17,0	0,00
Clorofila <i>b</i> (µg L ⁻¹)	13,61 ± 11,6	6,66 ± 7,2	40,88 ± 11,1	8,94 ± 9,6	12,04 ± 5,9	40,88 ± 11,1	63,71 ± 18,1	0,00	3,33 ± 1,4	10,01 ± 14,1	25,13 ± 14,6	4,61 ± 1,5	7,98 ± 5,1	25,13 ± 14,6	46,58 ± 15,0	0,00
Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)		10,67 ± 1,1	20,67 ± 5,0	15,33 ± 1,1	14,67 ± 2,3	20,67 ± 5,0	29,33 ± 8,0	0,00		15,33 ± 1,1	22,00 ± 6,0	18,00 ± 4,0	18,67 ± 2,3	22,00 ± 6,0	30,00 ± 6,0	0,00
Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	0,18 ± 0,1		0,24 ± 0,2	0,27 ± 0,03	0,23 ± 0,1	0,24 ± 0,24	0,58 ± 0,0	0,21 ± 0,1	0,17 ± 0,02		0,36 ± 0,07	0,30 ± 0,06	0,15 ± 0,02	0,36 ± 0,1	0,25 ± 0,2	0,27 ± 0,1
Fósforo total (µg L ⁻¹)	0,59 ± 0,3		0,97 ± 1,0	1,04 ± 0,2	0,82 ± 0,3	0,97 ± 1,0	2,46 ± 0,2	0,76 ± 0,5	0,56 ± 0,09		1,44 ± 0,3	1,18 ± 0,3	0,48 ± 0,1	1,44 ± 0,3	0,93 ± 0,81	1,01 ± 0,6
Nitrito (µg L ⁻¹)	148,78 ± 31,7		135,90 ± 23,0	154,6 ± 4	120,13 ± 46,8	135,9 ± 23,1	193,49 ± 10,0	124,5 ± 9	66,40 ± 22,2		93,83 ± 35,5	90,09 ± 11,7	162,65 ± 52,6	93,83 ± 35,5	138,7 ± 3	271,49 ± 111,5
Fósforo inorgânico (µg L ⁻¹)	4,96 ± 3,0		2,71 ± 0,5	4,32 ± 1,7	4,25 ± 1,1	2,71 ± 0,5	5,07 ± 0,9	6,26 ± 5,3	3,06 ± 1,7		2,73 ± 1,6	3,44 ± 0,7	5,69 ± 1,4	2,73 ± 1,6	11,04 ± 12,0	4,54 ± 1,1
Fosfato total dissolvido (µg L ⁻¹)	4,66 ± 4,5		32,60 ± 24,2	12,22 ± 2,5	35,24 ± 9,6	32,60 ± 24,3	63,18 ± 9,0	17,99 ± 12,5	3,67 ± 2,2		6,72 ± 4,3	13,21 ± 3,9	55,21 ± 23,0	6,72 ± 4,3	55,58 ± 19,6	21,5 ± 8,7
Nitrato (µg L ⁻¹)	22,12 ± 12,9		52,43 ± 28,2	25,46 ± 14,5	21,87 ± 12,1	52,43 ± 28,2	97,68 ± 8,0	69,92 ± 43,8	13,14 ± 7,7		21,03 ± 9,9	18,16 ± 3,1	16,75 ± 8,2	21,03 ± 9,9	80,12 ± 21,0	69,4 ± 13,7
Silicato (mg L ⁻¹)	51,96 ± 21,8		41,56 ± 7,3	46,39 ± 39,3	17,13 ± 9,1	41,56 ± 7,3	23,62 ± 7,3	36,25 ± 12,7	21,71 ± 10,1		44,79 ± 7,5	17,45 ± 10,5	17,56 ± 6,8	44,79 ± 7,5	44,04 ± 21,8	24,5 ± 4,9
Amônia (µg L ⁻¹)	1,90 ± 1,4		3,97 ± 2,4	104,3 ± 98,1	43,71 ± 3,8	3,97 ± 2,4	5,74 ± 1,7	3,99 ± 1,1	2,76 ± 1,8		4,59 ± 3,0	55,47 ± 27,0	83,40 ± 23,6	4,59 ± 3,0	5,64 ± 2,0	4,04 ± 1,3

	V								MV							
	T-7	T-1	T1	T7	T14	T28	T75	T150	T-7	T-1	T1	T7	T14	T28	T75	T150
Temperatura (°C)	23,50 ± 0,2	23,10 ± 0,2	20,10 ± 0,1	21,13 ± 0,1	19,73 ± 0,3	22,27 ± 0,1	21,53 ± 0,3	21,45 ± 0,0	23,77 ± 0,2	23,20 ± 0,4	20,27 ± 0,3	21,03 ± 0,3	19,83 ± 0,3	22,33 ± 0,3	21,27 ± 0,4	21,90
pH	6,57 ± 1,2	6,18 ± 0,8	4,69 ± 0,04	4,79 ± 0,04	5,60 ± 0,1	6,77 ± 0,05	6,93 ± 0,3	6,22 ± 0,9	5,57 ± 0,2	6,04 ± 0,1	4,62 ± 0,02	4,81 ± 0,03	5,30 ± 0,3	6,75 ± 0,0	7,11 ± 0,1	6,56
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	12,80 ± 4,2	28,47 ± 8,9	339,67 ± 12,8	442,60 ± 30,7	469,20 ± 36,4	541,00 ± 38,5	335,60 ± 156,6	115,5 ± 5	11,87 ± 4,4	30,03 ± 6,5	345,7 ± 4	430,53 ± 25,2	401,17 ± 22,6	521,5 ± 54,4	399,4 ± 3	263,70
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	3,34 ± 1,99	4,97 ± 2,5	1,77 ± 0,6	0,44 ± 0,2	0,15 ± 0,1	0,53 ± 0,23	0,16 ± 0,1	0,36 ± 0,0	3,85 ± 0,6	4,68 ± 0,6	1,12 ± 0,4	0,28 ± 0,07	0,2 ± 0,1	0,49 ± 0,3	0,08 ± 0,0	1,14
Oxigênio dissolvido saturado (%)	39,63 ± 22,3	55,53 ± 27,5	18,80 ± 7,1	4,83 ± 2,7	1,60 ± 1,0	5,53 ± 3,2	1,87 ± 1,6	4,25 ± 0,3	45,20 ± 8,0	53,03 ± 3,3	11,80 ± 5,0	3,10 ± 0,7	3,03 ± 1,6	4,93 ± 3,6	0,83 ± 0,8	11,30
Turbidez (mg L ⁻¹)	2,54 ± 1,6	6,67 ± 7,1	222,00 ± 70,8	142,3 ± 30,0	123,33 ± 15,1	34,90 ± 1,4	24,04 ± 18,8	14,92 ± 15,0	3,58 ± 3,1	1,68 ± 0,9	197,6 ± 7	150,33 ± 19,5	102,33 ± 10,2	43,67 ± 11,2	39,07 ± 13,4	16,66
Clorofila <i>a</i> (µg L ⁻¹)	14,23 ± 16,5	8,93 ± 10,8	41,76 ± 31,8	57,25 ± 38,1	60,28 ± 10,7	41,76 ± 31,8	22,55 ± 12,0	23,57 ± 11,7	2,85 ± 1,0	1,85 ± 0,9	60,43 ± 31,7	48,67 ± 10,7	59,97 ± 27,5	60,43 ± 31,7	31,62 ± 9,0	31,39
Clorofila <i>b</i> (µg L ⁻¹)	63,19 ± 101,1	17,36 ± 19,6	73,23 ± 63,4	15,42 ± 8,3	114,35 ± 37,2	73,23 ± 63,4	19,86 ± 12,5	18,97 ± 3,3	6,12 ± 2,3	2,22 ± 2,0	182,6 ± 7	25,50 ± 30,1	116,81 ± 59,6	182,6 ± 7	32,26 ± 18,3	29,17
Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)		40,67 ± 5,7	100,7 ± 87,7	156,7 ± 37,8	136,7 ± 32,1	100,7 ± 63,4	75,33 ± 15,1	19,00 ± 10,0		57,33 ± 11,0	166,7 ± 28,8	113,3 ± 5,7	133,3 ± 20,8	166,7 ± 28,8	82,67 ± 6,4	60,00
Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	0,32 ± 0,01		2,99 ± 0,7	1,90 ± 0,3	1,72 ± 0,4	2,99 ± 0,7	1,74 ± 1,2	0,63 ± 0,3	0,20 ± 0,03		2,81 ± 1,0	2,01 ± 0,3	1,27 ± 0,5	2,81 ± 1,0	1,76 ± 0,6	0,85 ± 0,5
Fósforo total (µg L ⁻¹)	1,23 ± 0,05		13,72 ± 3,2	8,62 ± 1,6	7,81 ± 2,0	13,72 ± 3,2	7,89 ± 6,0	2,71 ± 1,3	0,68 ± 0,2		12,87 ± 5,0	9,15 ± 1,6	5,68 ± 2,4	12,87 ± 5,0	7,97 ± 3,0	3,75 ± 2,1

Nitrito ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$90,25 \pm 29,1$	$1021,4 \pm 153,8$	$1048,7 \pm 266,6$	$891,0 \pm 250,7$	$1021,4 \pm 153,8$	$328,5 \pm 160,2$	$171,7 \pm 31,0$	$54,05 \pm 18,6$	$1506,1 \pm 415,2$	$1415,1 \pm 27,1$	$853,7 \pm 253,6$	$1506,1 \pm 415,2$	$807,1 \pm 1029,0$	$272,7 \pm 143,1$
Fósforo inorgânico ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$2,49 \pm 0,8$	$14,29 \pm 12,6$	$4,74 \pm 0,8$	$15,72 \pm 9,0$	$14,29 \pm 12,6$	$10,31 \pm 4,7$	$12,52 \pm 13,1$	$1,17 \pm 0,7$	$15,46 \pm 9,7$	$5,56 \pm 1,6$	$7,90 \pm 0,7$	$15,46 \pm 9,7$	$14,51 \pm 5,5$	$2,84 \pm 0,2$
Fosfato total dissolvido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$3,23 \pm 0,7$	$213,00 \pm 334,2$	$38,01 \pm 12,6$	$37,60 \pm 17,7$	$213,00 \pm 334,2$	$30,13 \pm 27,5$	$7,14 \pm 4,1$	$4,34 \pm 2,5$	$67,42 \pm 63,6$	$80,07 \pm 27,6$	$28,59 \pm 6,2$	$67,42 \pm 63,6$	$29,42 \pm 19,1$	$4,07 \pm 3,0$
Nitrato ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$10,82 \pm 3,0$	$353,8 \pm 385,7$	$171,4 \pm 116,9$	$35,4 \pm 17,8$	$353,8 \pm 385,7$	$133,0 \pm 52,3$	$52,9 \pm 21,1$	$11,43 \pm 6,6$	$265,4 \pm 186,5$	$229,9 \pm 12,3$	$25,7 \pm 16,0$	$265,4 \pm 186,5$	$250,5 \pm 108,6$	$31,1 \pm 10,0$
Silicato (mg L^{-1})	$15,10 \pm 0,5$	$41,47 \pm 9,5$	$62,66 \pm 30,1$	$93,90 \pm 15,7$	$41,47 \pm 9,5$	$25,85 \pm 0,5$	$37,97 \pm 23,0$	$15,53 \pm 9,0$	$27,33 \pm 2,7$	$40,02 \pm 8,7$	$29,45 \pm 4,0$	$27,33 \pm 2,7$	$25,64 \pm 3,3$	$23,3 \pm 8,6$
Amônia ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$1,96 \pm 0,6$	$5,59 \pm 2,2$	$150,6 \pm 4,1$	$208,80 \pm 11,2$	$5,59 \pm 2,2$	$5,45 \pm 1,0$	$3,37 \pm 0,8$	$1,58 \pm 1,0$	$5,56 \pm 0,8$	$2,56 \pm 0,3$	$123,79 \pm 19,8$	$5,56 \pm 0,8$	$6,85 \pm 1,9$	$3,14 \pm 1,0$

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas as práticas agrícolas vêm causando diversos impactos para o meio ambiente, principalmente a respeito do lançamento intencional ou não de substâncias indesejadas nos corpos d'água, especialmente os próximos das áreas urbanas e áreas de cultivo. Neste sentido, sendo parte fundamental dos ecossistemas aquáticos, a comunidade de macroinvertebrados bentônicos é fortemente influenciada por esses contaminantes que atingem seus habitats. Embora diversas características devam ser levadas em consideração quando se define os organismos bioindicadores para estudos ecotoxicológicos, os resultados obtidos nesse trabalho enfatizam a importância de se trabalhar com os macroinvertebrados bentônicos, pois responderam de formas diferentes aos impactos testados. Além disso, como visto, os macroinvertebrados são organismos diversos, uma vez que apresentam diferentes características funcionais, com tolerâncias diferenciadas aos efeitos tóxicos, sendo eles tolerantes, intolerantes ou resistentes às perturbações, e portanto, através das respostas da característica da comunidade obtida, seja pela perda de organismos, permanência e até mesmo reestabelecimento deles na comunidade, foi possível compreender e captar a saúde da água analisada pelo simples fato da presença ou não deles em um determinado período do experimento sob um determinado tratamento.

O estudo avaliando a toxicidade dos agrotóxicos que são amplamente aplicados na cultura da cana-de-açúcar e da vinhaça, separados e em mistura, também trouxeram reflexões sobre a ação destes de forma simultânea, evidenciando a importância e necessidade de investigações adicionais para se obter uma maior compreensão da interação dos mesmos, uma vez que entende-se que efeitos sinérgicos podem ocorrer.

A fertirrigação com vinhaça tem sido utilizada na agricultura como uma alternativa econômica e ambiental para um resíduo o qual não tinha destinação, mas entendendo que a presença da mesma nos corpos hídricos e compreendendo as diversas possibilidades da sua chegada nestes, bem como seu potencial poluidor, estudos mais abrangentes sobre a vantagem do seu uso precisam ser mais explorados. Vale ressaltar também que o estudo ter sido realizado utilizando do sistema de mesocosmos como uma forma de expressar características de poluição real facilitou na compreensão de como os complexos ecossistemas aquáticos são afetados e os processos nos quais os contaminantes são englobados e conseguem exercer seu potencial poluidor, ainda mais entendendo como os ecossistemas reagem de maneiras diferentes e como apresentam particularidades nas

suas formas de recuperação frente as mudanças nas quais estão susceptíveis. Além disso, levantou-se importância de experimentos realísticos, mais próximos do campo possibilitado pelos mesocosmos, algo a ser mais incorporado em futuros trabalhos de avaliações da qualidade ambiental utilizando organismos bioindicadores e reproduções reais de contaminação.