

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

LAIS ROBERTA SORIGOTTO

Caracterização dos efeitos ecotoxicológicos em espécies não-alvo decorrentes das práticas de manejo do solo em áreas de pastagem extensiva, pastagem intensiva e cana-de-açúcar

São Carlos

2022

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

LAIS ROBERTA SORIGOTTO

Caracterização dos efeitos ecotoxicológicos em espécies não-alvo decorrentes das práticas de manejo do solo em áreas de pastagem extensiva, pastagem intensiva e cana-de-açúcar

Trabalho de Graduação apresentado à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Engenheira Ambiental.

Coorientador: Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

Orientadora: Isabele Baima Ferreira Freitas

São Carlos

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRONICO, 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).

S185c Sorigotto, Lais Roberta
Caracterização dos efeitos ecotoxicológicos em
espécies não-alvo decorrentes das práticas de manejo do
solo em áreas de pastagem extensiva, pastagem intensiva
e cana-de-açúcar / Lais Roberta Sorigotto;
orientadora Isabele Baima Ferreira Freitas;
coorientador Evaldo Luiz Gaeta Espíndola. São Carlos,
2022.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2022.

1. Agrotóxicos. 2. 2,4-D. 3. Fipronil. 4.
Vinhaça. 5. Mesococos. 6. Ceriodaphnia silvestrii. 7.
Eruca sativa. 8. Chironomus sancticaroli. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Lais Roberta Sorigotto**

Data da Defesa: 22/06/2022

Comissão Julgadora:

Resultado:

Isabele Baima Ferreira Freitas (Orientador(a))


Aprovada

Lais Conceição Menezes Silva

Aprovada

Thandy Junio da Silva Pinto

Aprovada



Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091 Trabalho de Graduação

Dedico este trabalho à minha família, que sempre foi a maior apoiadora das minhas decisões e trajetória na Engenharia Ambiental.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Sandra e Fabiano, que sempre me incentivaram nos estudos e não mediram esforços para que eu tivesse uma formação de qualidade. E também ao meu irmão, Matheus, que sempre se mostrou curioso e entusiasmado com minhas conquistas.

Aos meus avós, Clara, Valdir, Dansila e Irineu, pelo carinho e apoio.

Ao meu professor e coorientador, Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, pelos ensinamentos, incentivos e auxílios prestados durante o período da pesquisa, além da oportunidade de conhecer um lugar tão incrível como o Pantanal durante a graduação.

À minha orientadora, Isabele Baima Ferreira Freitas, pela dedicação, auxílio, paciência e companhia no campo e laboratório. Por quem tenho muita admiração e desejo o maior sucesso do mundo!

Aos colegas do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), da Universidade de São Paulo (USP), que auxiliaram em algumas etapas do trabalho, e com quem dividi o laboratório, almoços, caronas e coletas.

À Profa. Dra. Cassiana C. Montagner e à Profa Dra Janaina Braga do Carmo pela parceria na realização de análises laboratoriais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de iniciação científica (Processo n° 2019/17132-3), a qual fez parte do projeto temático “*Environmental effects of the pasture-sugarcane and pasture intensification*” (Processo FAPESP n° 2015/18790-3).

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pela disponibilização da fazenda experimental na Unidade Regional de Pesquisa de Desenvolvimento em Brotas-SP, onde foram desenvolvidos os experimentos desta pesquisa (projeto temático FAPESP nº 2015/18790-3).

Aos meus amigos da 016 que levarei para toda a vida, e que tornaram a graduação muito mais proveitosa, leve e divertida. Ao Derek, pela amizade, aventuras, incentivos e troca de informações desde o primeiro ano da graduação. Ao Leonardo, pelos conselhos e companhia nos momentos bons (e de desespero) da nossa trajetória na faculdade.

Ao Patrick, pela sua simpatia e hospitalidade. À Isabella e Maria Beatriz, pelo apoio e amizade desde sempre. À Ahuana, Adriana, Val, Sônia e Karine, pelo acolhimento na nova cidade e contribuição para o meu crescimento profissional.

“Ninguém é pequeno demais para fazer a diferença.”

– Greta Thunberg

RESUMO

SORIGOTTO, L. R. **Caracterização dos efeitos ecotoxicológicos em espécies não-alvo decorrentes das práticas de manejo do solo em áreas de pastagem extensiva, pastagem intensiva e cana-de-açúcar.** 2022. 157 f. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

A crescente preocupação ambiental e a demanda pela substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis tornaram o Brasil o maior produtor mundial de cana-de-açúcar para geração de etanol. A expansão da cultura vem ocorrendo, principalmente, sobre pastagens subutilizadas, enquanto as pastagens remanescentes estão sendo intensificadas para compensar a perda de área. Ambos os processos estão associados ao uso intensivo de fertilizantes e agrotóxicos. Entre os agrotóxicos mais utilizados no cultivo da cana estão o 2,4-D (herbicida) e o fipronil (inseticida), e entre as práticas de fertilização destaca-se a fertirrigação com vinhaça, que podem atingir os ecossistemas aquáticos e causar efeitos tóxicos sobre organismos não-alvo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade da água e os efeitos ecotoxicológicos decorrentes das práticas de manejo do solo em pastagens extensivas, pastagens intensivas e cana-de-açúcar, utilizando três espécies não-alvo como bioindicadoras: *Ceriodaphnia silvestrii* (imobilidade e reprodução), *Eruca sativa* (germinação, comprimento da parte aérea e raiz) e *Chironomus sancticaroli* (mortalidade, crescimento, desenvolvimento e deformidade de mento), por meio de amostras coletadas em modelos ecossistêmicos (mesocosmos) inseridos nas três matrizes de uso do solo, considerando a variação temporal entre duas coletas (janeiro/2020 e agosto/2020). Para a análise da qualidade da água dos mesocosmos foram medidas variáveis físicas, químicas e biológicas *in situ* (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, turbidez, clorofila e condutividade elétrica) e em laboratório (nitrogênio total, nitrito, nitrato, íon amônio, fósforo total, fosfato total dissolvido, fosfato inorgânico, silicato, dureza, metais e agrotóxicos). Verificou-se que o manejo aplicado na intensificação do pasto e na cana-de-açúcar tem efeitos nas características físicas, químicas e biológicas dos mesocosmos, embora nem sempre tenha uma correspondência direta na toxicidade sobre as espécies testadas. A partir da quantificação do 2,4-D e fipronil nas amostras de água dos mesocosmos, aferiu-se que o tipo de cobertura do solo, o local de aplicação dos produtos e o período do ano (seco ou chuvoso) exercem influência sobre o transporte dos agrotóxicos para o corpo hídrico. Além disso, a presença desses produtos em amostras de água ou sedimento por um longo período após a sua aplicação é indicativo da sua persistência no ambiente. Quanto aos testes ecotoxicológicos, as amostras de água causaram efeito sobre a reprodução da *C. silvestrii*, provavelmente recebendo influência das condições de campo, como a concentração de nutrientes, e da presença dos agrotóxicos e vinhaça em mistura. Já a exposição do *C. sancticaroli* às amostras de sedimento levou ao aumento das deformidades nos organismos-teste, principalmente no tratamento da cana-de-açúcar, onde foi quantificada a maior concentração de fipronil. Quanto à *E. sativa*, a germinação das sementes e o comprimento da raiz e parte aérea indicaram uma possível influência da concentração de nutrientes para o melhor desenvolvimento das plantas, observado principalmente com as amostras do tratamento da cana-de-açúcar, onde houve fertilização (NPK) e fertirrigação (vinhaça). Com base nesses resultados, ressalta-se a importância de estudos desenvolvidos em campo e que considerem misturas de contaminantes em diferentes matrizes.

Palavras-chave: Agrotóxicos. 2,4-D. Fipronil. Vinhaça. Mesocosmos. *Ceriodaphnia silvestrii*. *Eruca sativa*. *Chironomus sancticaroli*.

ABSTRACT

SORIGOTTO, L. R. **Characterization of ecotoxicological effects on non-target species resulting from soil management practices in areas of extensive pasture, intensive pasture and sugarcane.** 2022. 157 f. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

Growing environmental concerns and the demand for replacing fossil fuels with biofuels have made Brazil the world's largest producer of sugarcane for ethanol generation. Crop expansion has been occurring mainly on underused pastures, while the remaining pastures are being intensified to compensate for the loss of area. Both processes are associated with the intensive use of fertilizers and pesticides. Among the most used pesticides in sugarcane culture are 2,4-D (herbicide) and fipronil (insecticide), and among the fertilization practices, fertigation with vinasse stands out, which can affect aquatic ecosystems and cause toxic effects on non-target organisms. The aim of the present study was to evaluate the water quality and ecotoxicological effects resulting from soil management practices in extensive pastures, intensive pastures and sugarcane, using three non-target species as bioindicators: *Ceriodaphnia silvestrii* (immobility and reproduction), *Eruca sativa* (germination, shoot and root length) and *Chironomus sancticaroli* (mortality, growth, development and mentum deformity), through samples collected in ecosystem models (mesocosms) inserted in the three land use matrices, considering the temporal variation between two collections (January/2020 and August/2020). For the analysis of the water quality of the mesocosms, physical, chemical and biological variables were measured *in situ* (pH, temperature, dissolved oxygen, turbidity, chlorophyll and electrical conductivity) and in laboratory (total nitrogen, nitrite, nitrate, ammonium ion, total phosphorus, total dissolved phosphate, inorganic phosphate, silicate, hardness, metals and pesticides). It was found that the management applied in pasture intensification and in sugarcane have effects on the physical, chemical and biological characteristics of the mesocosms, although it does not always have a direct correspondence in the toxicity on the tested species. From the quantification of 2,4-D and fipronil in the water samples of the mesocosms, it was verified that the type of soil cover, the place of application of the products and the period of the year (dry or rainy) influences the transport of pesticides to the water body. Furthermore, the presence of these products in water or sediment samples for a long period after their application is indicative of their persistence in the environment. As for the ecotoxicological tests, the water samples had an effect on the reproduction of *C. silvestrii*, probably being influenced by field conditions, such as the concentration of nutrients, and the presence of pesticides and vinasse in mixture. The exposure of *C. sancticaroli* to sediment samples led to an increase in deformities in the test organisms, especially in the treatment of sugarcane, where the highest concentration of fipronil was quantified. As for *E. sativa*, seed germination and the length of the root and shoot indicated a possible influence of the concentration of nutrients for the best development of the plants, mainly with the samples of the sugarcane treatment, where there was fertilization (NPK) and fertigation (vinasse). Based on these results, the importance of field studies that consider mixtures of contaminants in different matrices is emphasized.

Keywords: Pesticides. 2,4-D. Fipronil. Vinasse. Mesocosm. *Ceriodaphnia silvestrii*. *Eruca sativa*. *Chironomus sancticaroli*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da ordem sequencial de respostas a contaminantes em um sistema biológico	25
Figura 2 – Representação esquemática do transporte de agrotóxicos no ambiente.....	32
Figura 3 – Representação esquemática do modelo experimental inserido na fazenda experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) em Brotas-SP..	41
Figura 4 – Fotos aéreas das unidades de tratamento (esquerda) e mesocosmo (direita) na fazenda experimental de Brotas-SP.....	43
Figura 5 – Síntese dos experimentos realizados durante o período da pesquisa	44
Figura 6 – Início do teste com <i>E. sativa</i> (à esquerda) e fim do teste (à direita)	51
Figura 7 – Lâmina com <i>C. sancticaroli</i> e papel milimetrado para posterior medição do comprimento corporal dos organismos.....	52
Figura 8 – Exemplos de deformidades de mento em larvas do gênero <i>Chironomus</i> : em A – estrutura normal do mento, B – Köehn gap, C – excesso de dentes; D – falta de dentes; E – ausência de dentes; F – dentes desgastados.....	53
Figura 9 – Regressão linear para o comprimento corporal, biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas (AFDW) de <i>C. sancticaroli</i>	54
Figura 10 – Precipitação e temperatura do ar medidas durante o mês de janeiro/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma retangular, e dia da coleta em laranja).....	58
Figura 11 – Precipitação e temperatura do ar medidas durante o mês de agosto/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma retangular e dia da coleta indicado pela seta laranja)	59
Figura 12 – Velocidade do vento (km/h) a 2 m de altura medida durante o mês de janeiro/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma retangular, e dia da coleta em laranja).....	59
Figura 13 – Velocidade do vento (km/h) a 2 m de altura medida durante o mês de agosto/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma retangular, e dia da coleta em laranja)....	60
Figura 14 – Radiação solar (cal/cm ² /dia) medida durante o mês de janeiro/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma e dia da coleta em laranja)	60
Figura 15 – Radiação solar (cal/cm ² /dia) medida durante o mês de agosto/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma e dia da coleta em laranja)	61

Figura 16 – Gráfico de análise dos parâmetros <i>in situ</i> que reteve os dois primeiros componentes principais como mais significativos para explicar os dados (coleta de janeiro/2020).....	65
Figura 17 – Contribuições das variáveis (%) para PC1 (A) e PC2 (B). As variáveis analisadas foram condutividade, dureza, temperatura, clorofila <i>a</i> (Cl <i>a</i>), clorofila <i>b</i> (Cl <i>b</i>), pH, oxigênio dissolvido (OD) e turbidez (coleta de janeiro/2020)	65
Figura 18 – Diagrama da PCA para as variáveis físicas, químicas e biológicas medidas <i>in loco</i> nos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de janeiro/2020)	66
Figura 19 – Gráfico de análise de agrotóxicos que reteve o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (coleta de janeiro/2020).....	69
Figura 20 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1 e (B) PC2. As variáveis analisadas foram fipronil, fipronil sulfona, fipronil sulfide e 2,4-D (coleta de janeiro/2020).....	69
Figura 21 – Diagrama da PCA para os agrotóxicos quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de janeiro/2020).....	69
Figura 22 – Gráfico de análise de nutrientes que reteve os dois primeiros componentes principais como mais significativos para explicar os dados (coleta de janeiro/2020).....	76
Figura 23 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1 e (B) PC2. As variáveis analisadas foram fósforo total dissolvido (PTD), fósforo inorgânico (Pi), silicato (SiO ₂), nitrato (NO ₃ ⁻), nitrito (NO ₂ ⁻), nitrogênio total (NT), fósforo total (PT) e íon amônio (NH ₄ ⁺) (coleta de janeiro/2020).....	77
Figura 24 – Diagrama da PCA para os nutrientes quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de janeiro/2020)	77
Figura 25 – Gráfico de análise de metais que reteve o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (coleta de janeiro/2020).....	84
Figura 26 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1 e (B) PC2 (B). As variáveis analisadas foram bário, estrôncio, manganês, potássio, molibdênio, cobre, zinco, níquel, cádmio e alumínio (coleta de janeiro/2020)	84
Figura 27 – Diagrama da PCA para os metais quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de janeiro/2020)	85
Figura 28 – Gráfico de análise de parâmetros <i>in situ</i> que reteve o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (coleta de agosto/2020)	90

Figura 29 – Contribuições das variáveis (%) para PC1 (A) e PC2 (B). As variáveis analisadas foram condutividade, dureza, temperatura, clorofila <i>a</i> (Cl a), clorofila <i>b</i> (Cl b), pH, oxigênio dissolvido (OD) e turbidez (coleta de agosto/2020).....	91
Figura 30 – Diagrama da PCA para as variáveis físicas, químicas e biológicas medidas <i>in loco</i> nos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de agosto/2020).....	91
Figura 31 – Gráfico de análise de agrotóxicos que reteve o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (coleta de agosto/2020).....	94
Figura 32 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1 e (B) PC2. As variáveis analisadas foram fipronil, fipronil sulfona, fipronil sulfide e 2,4-D (coleta de agosto/2020)	95
Figura 33 – Diagrama da PCA para os agrotóxicos quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de agosto/2020)	95
Figura 34 – Gráfico de análise de nutrientes que reteve o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (coleta de agosto/2020)	99
Figura 35 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1 e (B) PC2. As variáveis analisadas foram fósforo total dissolvido (PTD), fósforo inorgânico (Pi), silicato (SiO ₂), nitrato (NO ₃ ⁻), nitrito (NO ₂ ⁻), nitrogênio total (NT), fósforo total (PT) e íon amônio (NH ₄ ⁺) (coleta de agosto/2020)	99
Figura 36 – Diagrama da PCA para os nutrientes quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de agosto/2020).....	100
Figura 37 – Gráfico de análise de metais que reteve os três primeiros componentes principais como mais significativos para explicar os dados (coleta de agosto/2020).....	103
Figura 38 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1, (B) PC2 e (C) PC3. As variáveis analisadas foram bário, estrôncio, manganês, potássio, molibdênio, cobre, zinco, níquel, cádmio, cromo e alumínio (coleta de agosto/2020).....	103
Figura 39 – Diagrama da PCA para os metais quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de agosto/2020).....	104
Figura 40 – Diagrama da PCA para os metais quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC3 (coleta de agosto/2020).....	104
Figura 41 – Resultados do teste de toxicidade crônica para a espécie <i>C. silvestrii</i> em amostras de água de cada mesocosmo (coleta de janeiro/2020).....	108
Figura 42 – Resultados do teste de toxicidade crônica para a espécie <i>C. silvestrii</i> como média do número de neonatas em cada tratamento de solo (coleta de janeiro/2020)	108

Figura 43 – Resultados do teste de toxicidade crônica para a espécie <i>C. silvestrii</i> em amostras de água de cada mesocosmo (coleta de agosto/2020)	109
Figura 44 – Resultados do teste de toxicidade crônica para a espécie <i>C. silvestrii</i> como média do número de neonatas em cada tratamento (coleta de agosto/2020)	109
Figura 45 – Resultados do teste de toxicidade crônica para a espécie <i>C. silvestrii</i> para as amostras de escoamento superficial (coleta em janeiro/2020)	112
Figura 46 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio da raiz e da parte aérea da espécie <i>E. sativa</i> , para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de janeiro/2020)	115
Figura 47 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio da raiz e da parte aérea da espécie <i>E. sativa</i> , como média de cada tratamento (coleta de janeiro/2020)	115
Figura 48 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio da raiz e da parte aérea da espécie <i>E. sativa</i> , para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de agosto/2020)	117
Figura 49 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio da raiz e da parte aérea da espécie <i>E. sativa</i> , como média de cada tratamento (coleta de agosto/2020).....	118
Figura 50 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio da raiz e da parte aérea da espécie <i>E. sativa</i> , para amostras de escoamento superficial.....	119
Figura 51 – Diagrama da RDA para as variáveis físicas, químicas e biológicas e testes de toxicidade com <i>C. silvestrii</i> e <i>E. sativa</i> referentes às amostras de água coletadas nos mesocosmos em janeiro/2020.....	121
Figura 52 – Diagrama da RDA para as variáveis físicas, químicas e biológicas e testes de toxicidade com <i>C. silvestrii</i> e <i>E. sativa</i> referentes às amostras de água coletadas nos mesocosmos em agosto/2020	122
Figura 53 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio corporal da espécie <i>C. sancticaroli</i> , para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de janeiro/2020).....	125
Figura 54 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio corporal da espécie <i>C. sancticaroli</i> , como média de cada tratamento (coleta de janeiro/2020)	125
Figura 55 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio corporal da espécie <i>C. sancticaroli</i> , para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de agosto/2020)	126
Figura 56 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio corporal da espécie <i>C. sancticaroli</i> , como média de cada tratamento (coleta de agosto/2020)	126

Figura 57 – Biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas da espécie <i>C. sancticaroli</i> ao fim do teste de toxicidade (coleta de janeiro/2020)	127
Figura 58 – Biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas da espécie <i>C. sancticaroli</i> ao fim do teste de toxicidade, como média de cada tratamento (coleta de janeiro/2020)	127
Figura 59 – Biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas da espécie <i>C. sancticaroli</i> ao fim do teste de toxicidade (coleta de agosto/2020).....	128
Figura 60 – Biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas da espécie <i>C. sancticaroli</i> ao fim do teste de toxicidade, como média de cada tratamento (coleta de agosto/2020).....	128
Figura 61 – Largura da cápsula cefálica da espécie <i>C. sancticaroli</i> ao fim do teste de toxicidade para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de janeiro/2020).....	130
Figura 62 – Largura da cápsula cefálica da espécie <i>C. sancticaroli</i> ao fim do teste de toxicidade como média de cada tratamento (coleta de janeiro/2020)	131
Figura 63 – Largura da cápsula cefálica da espécie <i>C. sancticaroli</i> ao fim do teste de toxicidade para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de agosto/2020).....	131
Figura 64 – Largura da cápsula cefálica da espécie <i>C. sancticaroli</i> ao fim do teste de toxicidade como média de cada tratamento (coleta de agosto/2020). Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$)	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de fertilizantes (NPK) e agrotóxicos aplicados nos tratamentos PI e C	42
Tabela 2 – Caracterização físico-química da vinhaça bruta utilizada neste estudo.....	42
Tabela 3 – Caracterização dos principais eventos ocorridos nos tratamentos de pastagem extensiva, pastagem intensiva e cana-de-açúcar durante dois ciclos de cana-de-açúcar.....	43
Tabela 4 – Métodos de análises das amostras de água em laboratório.....	45
Tabela 5 – Comprimento de onda da análise de metais pelo MP-AES, e seus limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).	46
Tabela 6 – Classificação do estado trófico para rios a partir da faixa de IET (Índice de Estado Trófico).....	48
Tabela 7 – Síntese das condições de ensaio para os testes agudos e crônicos com a espécie <i>C. silvestrii</i>	50
Tabela 8 – Largura da cápsula cefálica e tempo de duração em condições normais dos quatro instares de desenvolvimento para a espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> cultivada com Tetramin®	55
Tabela 9 – Síntese das condições de ensaio para os testes subcrônicos com a espécie <i>C. sancticaroli</i>	55
Tabela 10 – Variáveis físicas, químicas e biológicas (clorofila) da água dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05.....	62
Tabela 11 – Quantificação de agrotóxicos na água dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05.....	67
Tabela 12 – Quantificação de agrotóxicos nas amostras de água de escoamento superficial nos três tipos de tratamento de solo	71
Tabela 13 – Quantificação de agrotóxicos no sedimento dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020).....	73
Tabela 14 – Quantificação de nutrientes das amostras de água dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05	74
Tabela 15 – Quantificação de nutrientes das amostras de água de escoamento superficial nos três tipos de tratamento de solo	79

Tabela 16 – Quantificação de metais nas amostras de água dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05	83
Tabela 17 – Quantificação de metais nas amostras de água do escoamento superficial	86
Tabela 18 – Classificação do estado trófico dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020).....	87
Tabela 19 – Variáveis físicas, químicas e biológicas (clorofila) das águas dos mesocosmos (coleta de agosto/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05	89
Tabela 20 – Quantificação de agrotóxicos nos mesocosmos (coleta de agosto/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05	93
Tabela 21 – Quantificação de agrotóxicos no sedimento dos mesocosmos (coleta de agosto/2020)	96
Tabela 22 – Quantificação de nutrientes das amostras de água dos mesocosmos (coleta de agosto/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05	98
Tabela 23 – Quantificação de metais nas amostras de água dos mesocosmos (coleta de agosto/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05	102
Tabela 24 – Classificação do estado trófico dos mesocosmos (coleta de agosto/2020).....	106
Tabela 25 – Resultado dos testes de toxicidade aguda para a espécie <i>C. silvestrii</i>	107
Tabela 26 – Resultado do teste de toxicidade aguda para a espécie <i>C. silvestrii</i> para as amostras de escoamento superficial (coleta em janeiro/2020)	112
Tabela 27 – Resultado dos testes de germinação para a espécie <i>E. sativa</i>	114
Tabela 28 – Resultado do teste de germinação para a espécie <i>E. sativa</i> para as amostras de escoamento superficial (coleta de agosto/2020).....	118
Tabela 29 – Resultado dos testes de toxicidade para a espécie <i>C. sancticaroli</i>	123
Tabela 30 – Frequência de deformidade de mento e alterações das larvas saudáveis com dentes desgastados (coleta de janeiro/2020).....	134
Tabela 31 – Frequência de deformidade de mento e alterações das larvas saudáveis com dentes desgastados (coleta de agosto/2020).	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFDW	Biomassa seca livre de cinzas
APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
C	Tratamento de cana-de-açúcar
CL ₅₀	Concentração que causa mortalidade de 50% dos organismos-teste
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CRHEA	Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
EC ₅₀	Concentração efetiva que provoca efeito adverso em 50% dos organismos-teste
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IC ₅₀	Concentração de inibição em 50% da reprodução dos organismos-teste
IET	Índice do Estado Trófico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NBR	Norma Brasileira
NEEA	Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada
NT	Nitrogênio total
OD	Oxigênio dissolvido
PCA	Análise de Componentes Principais
PC1	Primeiro componente principal
PC2	Segundo componente principal
PC3	Terceiro componente principal
PE	Tratamento de pasto extensivo
PEAD	Polietileno de alta densidade
pH	Potencial hidrogeniônico

PI	Tratamento de pasto intensivo
Pi	Fosfato inorgânico
PT	Fósforo total
PTD	Fósforo total dissolvido
RDA	Análise de Redundância
US-EPA	<i>United State Environmental Protection Agency</i>
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i>
2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1	IMPACTOS SOBRE OS SISTEMAS AQUÁTICOS	24
2.2	MONITORAMENTO ECOTOXICOLÓGICO	25
2.3	MESOCOSMOS COMO UNIDADE EXPERIMENTAL	27
2.4	ORGANISMOS INDICADORES	28
2.5	PASTAGENS E CANA-DE-AÇÚCAR	29
2.6	AGROTÓXICOS	31
2.6.1	2,4-D.....	32
2.6.2	Fipronil	34
2.7	VINHAÇA	37
3	OBJETIVOS.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	ÁREA DE ESTUDO E MODELO EXPERIMENTAL	40
4.2	CARACTERIZAÇÃO CLIMATOLÓGICA.....	44
4.3	ABORDAGEM EXPERIMENTAL DA PESQUISA	44
4.4	AMOSTRAGEM E ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS	44
4.4.1	Índice do Estado Trófico (IET) dos mesocosmos	47
4.5	TESTES DE TOXICIDADE	49
4.5.1	Testes de toxicidade com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	49
4.5.2	Teste de toxicidade com <i>Eruca sativa</i>	50
4.5.3	Testes de toxicidade com <i>Chironomus sancticaroli</i>	51
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	CARACTERIZAÇÃO CLIMATOLÓGICA.....	58
5.1.1	Precipitação e temperatura do ar	58

5.1.2	Velocidade do vento	59
5.1.3	Radiação solar.....	60
5.2	ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS (JANEIRO/2020)	61
5.2.1	Parâmetros medidos <i>in loco</i>	61
5.2.2	Agrotóxicos em amostras de água e sedimento dos mesocosmos.....	66
5.2.3	Nutrientes	73
5.2.4	Metais	80
5.2.5	Índice do Estado Trófico (IET)	86
5.3	ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS (AGOSTO/2020).....	88
5.3.1	Parâmetros medidos <i>in loco</i>	88
5.3.2	Agrotóxicos em amostras de água e sedimento dos mesocosmos.....	92
5.3.3	Nutrientes	97
5.3.4	Metais	100
5.3.5	Índice do Estado Trófico (IET)	105
5.4	TESTES DE TOXICIDADE	106
5.4.1	Testes de toxicidade com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	106
5.4.2	Testes de toxicidade com <i>Eruca sativa</i>	114
5.4.3	Análise de Redundância (RDA)	120
5.4.4	Testes de toxicidade com <i>Chironomus sancticaroli</i>	123
6	CONCLUSÕES.....	137
	REFERÊNCIAS	139

1 INTRODUÇÃO

Desde a Revolução Industrial, os padrões de produção e consumo de energia têm se baseado nas fontes fósseis, que geram emissões de poluentes, gases de efeito estufa e põem em risco o suprimento desses recursos à longo prazo no planeta (GOLDEMBERG; LUCON, 2007). A crescente preocupação mundial com questões ambientais e o surgimento de acordos globais, como o Protocolo de Quioto (1997) e o Acordo de Paris (2015), os quais possuem como cláusula a substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis, incentivaram a instituição da Política Nacional dos Biocombustíveis (RenovaBio) no Brasil, em 2017 (VIEGAS; RAMOS; FERNANDES, 2018). A lei tem como objetivo a expansão de biocombustíveis na matriz energética nacional, a fim de cumprir o Acordo de Paris e promover a redução na emissão de gases de efeito estufa, respeitando os pressupostos de desenvolvimento sustentável, com expectativa de alcançar, no país, uma produção de 50 bilhões de litros anuais de etanol em 2030 (BRASIL, 2017; MELO, 2018).

As grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis, aliadas ao aumento da demanda por biocombustíveis, tornam o Brasil o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área de cultivo que atingiu 8,6 milhões de hectares, responsável por 23% da produção mundial de açúcar (BORDONAL et al., 2018; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2021). Por não ser particularmente exigente em termos de solo e adaptar-se razoavelmente bem em solos de fertilidade média e com alta porosidade, a cultura de cana-de-açúcar expandiu-se intensamente no país (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008).

O estado de São Paulo é o maior produtor de cana-de-açúcar no Brasil, correspondendo a 50% da produção nacional (CONAB, 2022). Neste estado, entre 2002 e 2006 a maior parte da expansão de canaviais ocorreu sobre áreas subutilizadas de pastagem, decorrentes de abandono ou degradação devido ao manejo inadequado (DIAS-FILHO, 2014; LORA et al., 2006). Em São Paulo, o processo de conversão de pastagens em cana-de-açúcar ocorreu predominantemente no Oeste e Noroeste do estado, com redução de 53,5% das áreas de pastagem e aumento de 143,8% das áreas de cultivo de cana entre os anos de 1999 e 2019 (OGURA et al., 2022a). Um dos aspectos positivos da expansão da cultura de cana-de-açúcar sobre essas áreas é a redução da ameaça de conversão irreversível de ecossistemas virgens,

como florestas tropicais, em áreas desmatadas para produção agrícola (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008).

O manejo agrícola que maximiza a produção de cana-de-açúcar e reduz perdas por pragas e ervas daninhas é baseado no consumo elevado de fertilizantes e agrotóxicos, os quais implicam em impactos negativos ao meio ambiente e comunidades de diferentes compartimentos ambientais (FRIMPONG et al., 2018; TURETTA et al., 2017). O Brasil é considerado o maior mercado mundial de agrotóxicos desde 2008 e, dentre os ingredientes ativos mais utilizados na cultura da cana-de-açúcar, estão o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D, herbicida) e o fipronil (inseticida) (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB, 2010; RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014). Apesar de aplicados com a finalidade de eliminar organismos que prejudiquem a produtividade da cultura, os agrotóxicos também põem em risco organismos não-alvo presentes nos diferentes compartimentos ambientais. Em ecossistemas aquáticos, por exemplo, a contaminação pode ocorrer diretamente pela ação do vento no momento da aplicação (*spray drift*), por escoamento superficial e por lixiviação (CEREJEIRA et al., 2003; NEGRO, 2013).

Outro composto utilizado no cultivo de cana-de-açúcar é a vinhaça, usada como fertilizante devido aos índices elevados de matéria orgânica e micronutrientes em sua composição (MARINHO et al., 2014). A vinhaça é um subproduto gerado em indústrias sucroalcooleiras, sendo obtidos de 8 a 18 L do efluente para cada litro de álcool produzido (FERREIRA et al., 2011). Apesar do seu reuso em práticas de fertirrigação ser benéfico ao crescimento da cultura, a vinhaça representa um potencial poluidor, dada a carga orgânica e corrosividade elevada e pH ácido (FUESS; GARCIA, 2014). Além disso, pode atingir cursos d'água e causar efeitos tóxicos letais e subletais sobre as comunidades biológicas, dependendo do tipo de solo e da concentração aplicada do composto (ALVES et al., 2015).

Para a determinação dos efeitos de agentes químicos e físicos, como por exemplo agrotóxicos e a vinhaça, sobre a estrutura, função e biodiversidade dos ecossistemas, surge a Ecotoxicologia, que consiste em uma ferramenta de monitoramento ambiental baseada na resposta de organismos vivos às substâncias estressoras (COSTA et al., 2008; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Em testes ecotoxicológicos, utilizam-se organismos indicadores, os quais apresentam alguma alteração – fisiológica, morfológica ou comportamental – quando expostos a determinados contaminantes, de modo que funcionem

como “biosensores” da qualidade do ambiente analisado, seja este aquático ou terrestre (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Considerando o uso intensivo de agroquímicos no cultivo da cana-de-açúcar, faz-se necessário um estudo abrangente da toxicidade dos produtos mais utilizados – 2,4-D, fipronil e vinhaça – em mistura e em escalas mais próximas do que acontece no ambiente natural. Nesta pesquisa, realizaram-se testes de toxicidade em laboratório, com amostras de água e sedimento coletadas em modelos ecossistêmicos inseridos dentro de três matrizes de uso do solo (pastagem extensiva, pastagem intensiva e cana-de-açúcar), utilizando como bioindicadores espécies não-alvo de modo que se avaliem os efeitos diretos e indiretos causados às populações e que podem influenciar em nível de comunidade. Os testes foram realizados com as espécies *Ceriodaphnia silvestrii* (representativa do contato direto com a água contaminada – habitat), *Eruca sativa* (espécie representativa do contato indireto com a água contaminada – irrigação) e *Chironomus sancticaroli* (indicadores da qualidade de dois compartimentos ambientais – água e sedimento). Este tipo de pesquisa é essencial para uma avaliação realista de como a expansão da cana-de-açúcar sobre áreas de pastagem pode afetar os ecossistemas aquáticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPACTOS SOBRE OS SISTEMAS AQUÁTICOS

A produção agrícola em larga escala baseada no uso intensivo de agrotóxicos e fertilizantes caracteriza-se como uma ação antrópica responsável pela ameaça à integridade ecológica dos ecossistemas aquáticos, causando impactos no habitat, qualidade da água e, conseqüentemente, nos ecossistemas (MARTINS; OLIVEIRA; SALCEDO, 2014). Os compartimentos de um sistema aquático são compostos por coluna d'água, sedimento e biota, a partir dos quais se realizam avaliações de qualidade ambiental, a fim de mensurar os impactos sobre os ecossistemas e transmitir informações científicas (RAMOS, 1996).

Por agirem como integradores dos processos biogeoquímicos, os sistemas aquáticos são caracterizados como destino de poluentes, incluindo os agrotóxicos (MARTINI et al., 2012). O comportamento dos agrotóxicos nesses sistemas depende de processos de retenção (sorção, absorção), transformação (hidrólise, fotólise, complexação e biodegradação), transporte (deriva, volatilização, lixiviação e escoamento superficial) e acumulação ao longo da cadeia trófica (COSTA et al., 2008; SPADOTTO, 2006). Além desses processos e da interação entre eles, o destino dos contaminantes também tem influência das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, quantidade e frequência de uso, métodos de aplicação, características bióticas e abióticas do ambiente e condições meteorológicas (BORSOI et al., 2014).

Na coluna d'água, a concentração das substâncias varia de forma significativa temporalmente, em função do fluxo de água, interferências antrópicas e interações entre o ambiente e outras substâncias (RAMOS, 1996). No compartimento sedimentar, ocorre uma acumulação preferencial dos contaminantes, cuja concentração é geralmente superior à da água e decai lentamente ao longo do tempo, servindo como uma importante fonte de informação a respeito da contaminação do corpo hídrico receptor (GAMA, 2018; SILVA; ZINI; CARAMÃO, 2010).

Os impactos nos sistemas aquáticos também resultam em uma série de respostas da biota a fatores de perturbação, a qual se comporta como indicadora da biodisponibilidade dos contaminantes (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Além do princípio ativo tóxico, os agrotóxicos possuem outros elementos potencialmente poluidores, tais como metais pesados, surfactantes e emulsificantes, e, em geral, quanto maior a concentração e o tempo de

exposição à essas substâncias, aumentam-se as chances de impactos negativos atingirem os níveis superiores de organização biológica (ARIAS et al., 2007; COSTA, 2004), conforme ilustrado na Figura 1.

Porém, a compreensão das respostas aos efeitos dos contaminantes geralmente são maiores nos níveis mais baixos de organização biológica, devido ao fato de ocorrerem mais rapidamente e por estarem diretamente ligados à exposição (ARIAS et al., 2007). Assim, é necessária uma abordagem integrada para avaliar o efeito tóxico de substâncias poluentes em ecossistemas aquáticos, a qual pode ser realizada por meio do monitoramento ecotoxicológico.

Figura 1 – Representação da ordem sequencial de respostas a contaminantes em um sistema biológico



Fonte: Adaptado de Arias et al. (2007)

2.2 MONITORAMENTO ECOTOXICOLÓGICO

A ecotoxicologia pode ser definida como a ciência que se dedica ao estudo e prevenção dos efeitos adversos de substâncias químicas nos ecossistemas, considerando sua estrutura, funcionamento e biodiversidade (TARAZONA; RAMOS-PERALONSO, 2014). Apesar de abranger tanto substâncias naturais quanto sintéticas, o escopo da Ecotoxicologia está nos produtos desenvolvidos por atividades humanas, os quais se mostram com maior capacidade de toxicidade e biodisponibilidade, aumentando a exposição sobre o conjunto de organismos que habitam a biosfera (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008; TARAZONA; RAMOS-PERALONSO, 2014).

Dentre as áreas da ecotoxicologia, o componente aquático sempre foi um dos fundamentais, visto que os principais problemas de poluição ambiental envolvem a hidrosfera, e o ecossistema em questão recebe tanto os contaminantes lançados diretamente nos corpos d'água (fontes de poluição pontual) quanto os provenientes do solo ou do ar (fontes de poluição difusas) (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; ZHAO; NEWMAN, 2005). A fim de avaliar os efeitos dessas substâncias tóxicas nos organismos aquáticos a nível celular, individual, populacional e em comunidades, bem como o comportamento e as transformações dos poluentes no ecossistema, faz-se uso da ecotoxicologia aquática (BERTOLETTI; ZAGATTO, 2006).

A relação entre a substância química e o sítio alvo de um organismo é denominado exposição, podendo ocorrer por meio da água e do sedimento (nos quais os contaminantes são introduzidos por meio da superfície do corpo e pelos tecidos respiratórios de organismos aquáticos) ou pela ingestão de alimentos contaminados (RAND; WELLS; MCCARTY¹, 1995 *apud* COSTA et al., 2008). Dessa forma, os efeitos tóxicos são determinados pela dose biologicamente ativa do contaminante que atinge as células, sítios e membranas dos indivíduos de uma espécie, e, portanto, não podem ser estimados apenas com a concentração ambiental de uma substância (COSTA et al., 2008).

Nesse sentido, as análises físico-químicas individuais em laboratório apenas identificam e quantificam as concentrações de substâncias potencialmente tóxicas, mas não retratam o seu impacto no ambiente e a interação entre poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Em escala de campo, no entanto, os organismos sofrem exposição múltipla de diversos tipos de contaminantes presentes no ambiente, cuja interação pode ser sinérgica, na qual o efeito torna-se maior que a soma das toxicidades individuais, antagônica, na qual o efeito torna-se menor que a soma das toxicidades individuais, ou aditiva, sendo a soma dos efeitos individuais (SILVA; SANTOS, 2007). Portanto, os testes de toxicidade e as análises físico-químicas *in situ* se complementam, uma vez que avaliam os efeitos dessas substâncias sobre sistemas biológicos (COSTA et al., 2008).

¹ RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. *In*: RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**: effects, environmental fate, and risk assessment. 2.ed. Washington: Taylor & Francis, 1995. Cap. 1.

Os testes de toxicidade podem ser divididos em agudos e crônicos. Os agudos são realizados em um curto período de exposição dos organismos ao contaminante ou à amostra ambiental, e avaliam os efeitos severos sofridos, como a mortalidade. Já os testes crônicos são de longa duração e medem os efeitos indiretos do agente, tais como crescimento, reprodução e alterações subletais, utilizando o ciclo de vida completo do organismo (BERTOLETTI; ZAGATTO, 2006; FRACÁCIO, 2001). Assim, por meio dos efeitos letais e subletais é possível estabelecer o grau de toxicidade dos contaminantes sobre os organismos testados.

Complementarmente aos testes de toxicidade, os parâmetros físico-químicos são analisados como forma de monitoramento da qualidade de água, atendimento à legislação vigente, influências sobre os organismos presentes no ecossistema aquático e identificação dos padrões de variação das condições ambientais. Os parâmetros também podem afetar a biodisponibilidade dos contaminantes ou transformá-los em formas mais tóxicas ou menos tóxicas, portanto, são relacionáveis aos resultados dos testes ecotoxicológicos (PRÓSPERI, 2002). Estes parâmetros podem ser medidos *in situ*, como é o caso do potencial hidrogeniônico (pH), temperatura, oxigênio dissolvido (OD), turbidez, clorofila e condutividade elétrica, ou em laboratório, tal como dureza, nutrientes, metais e quantificação de agrotóxicos.

2.3 MESOCOSMOS COMO UNIDADE EXPERIMENTAL

O monitoramento ecotoxicológico pode ser realizado em campo ou em condições controladas de laboratório. Estudos laboratoriais são amplamente utilizados e facilmente padronizáveis. Em contrapartida, os estudos *in situ* (campo e semi-campo) possuem uma abordagem mais realista, visto que incluem uma maior variedade de espécies e consideram a interação entre os organismos no ambiente, portanto são usados para confirmar e complementar os resultados derivados dos testes convencionais de laboratório (BERTOLETTI; ZAGATTO, 2006; SOLOMON; HANSON, 2014).

Uma das maneiras de se realizar testes ecotoxicológicos em condição de semi-campo é por meio de unidades experimentais, como microcosmos e mesocosmos. A característica fundamental dos cosmos é a inclusão de múltiplos componentes ecológicos com o objetivo de simular processos ecológicos tais como eles ocorrem na natureza, podendo também incluir exposição a condições climáticas (SOLOMON; HANSON, 2014).

Os mesocosmos permitem a realização de testes com organismos de diferentes níveis tróficos, e são considerados um nível intermediário entre estudos de campo e laboratório, sob condições simuladas e controladas (ODUM, 1983). Esse modelo possibilita incorporar a resposta geral da comunidade à determinado agente estressor, visto que a sensibilidade dos organismos varia e difere das respostas de espécies individuais, tal como é analisado no laboratório (SOLOMON; HANSON, 2014).

Além da observação e quantificação dos efeitos toxicológicos, o uso de mesocosmos também permite prever o destino e o efeito dos contaminantes sob condições semelhantes às que ocorrem no ambiente natural, incluindo a presença de sedimentos, animais e plantas (JAK; MAAS; SCHOLTEN, 1996). Dessa forma, evidenciam-se as condições ecológicas que podem influenciar nas respostas dos organismos testados, tais como os fatores abióticos naturais (luz, temperatura, pH, condutividade, dureza etc.), e o comportamento do contaminante, o qual está sujeito a processos de transporte e de transformação no ambiente (COSTA et al., 2008; SOLOMON; HANSON, 2014). Entre eles, os fatores como partição, degradação e dissipação são raramente contabilizados em estudos laboratoriais de toxicidade, mas podem influenciar significativamente na resposta ecológica ao agente estressor (SOLOMON; HANSON, 2014).

2.4 ORGANISMOS INDICADORES

Os testes ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores, os quais possuem pequeno limite de tolerância a determinadas substâncias, apresentando alterações fisiológicas, morfológicas e/ou comportamentais quando expostos ao contaminante (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Quanto à escolha desses organismos, os seguintes critérios são levados em consideração: facilidade de cultivo e adaptação em laboratório, abundância e disponibilidade, importância comercial, estabilidade genética nas populações e vastas informações literárias sobre a biologia da espécie, a fim de facilitar a interpretação dos resultados (RAND; WELLS; MCCARTY², 1995 *apud* COSTA et al., 2008).

² RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. *In*: RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**: effects, environmental fate, and risk assessment. 2.ed. Washington: Taylor & Francis, 1995. Cap. 1.

Além disso, os efeitos tóxicos de uma amostragem são mais representativos quando utilizados organismos de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar como bioindicadores (VERSONNEN; SOBANSKA; CESNAITIS, 2014). O uso de organismos bioindicadores de diferentes espécies e níveis tróficos permite o conhecimento sobre a qual nível o contaminante interage com o organismo e quais os efeitos causados para cada nível trófico e em cada espécie (BAGLIANO, 2012; SILVA-DE-SÁ et al., 2019). Os organismos classificados como consumidores primários possuem contato direto com os agrotóxicos. Entre eles, a espécie *Ceriodaphnia silvestrii* é considerada um ótimo organismo indicador para ecossistemas aquáticos de regiões tropicais, uma vez que é amplamente distribuída na América do Sul, tem ciclo de vida curto, é de fácil manutenção e cultivo em laboratório, apresenta alta sensibilidade a diversas substâncias tóxicas e possui diretrizes padronizadas para testes de toxicidade (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT, 2017; CASALI-PEREIRA et al. 2015; MANSANO et al. 2018). Os macroinvertebrados bentônicos, tal como *Chironomus sancticaroli*, apresentam potencial como bioindicadores da qualidade da água e do sedimento, por habitarem a região de interface entre eles. Além disso, exercem função crucial na disponibilidade de matéria e energia para os níveis tróficos superiores, portanto o crescimento dos organismos é um parâmetro amplamente utilizado em testes ecotoxicológicos para indicar efeitos em nível de ecossistema (SIBLEY; BENOIT; ANKLEY, 1997). As plantas também são utilizadas como bioindicadores pois desempenham um papel significativo na transferência de energia na cadeia alimentar e na definição de habitat, além do fácil cultivo e adaptação ao estresse ambiental (AL-QURAINY, 2010). Entre as espécies, a *Eruca sativa* apresenta sensibilidade à inseticidas e herbicidas, evidenciada através da fitotoxicidade, ou seja, pela capacidade de agentes estressores em causar danos às plantas (OGURA et al., 2022b).

2.5 PASTAGENS E CANA-DE-AÇÚCAR

O agronegócio é uma das principais atividades econômicas desenvolvidas no Brasil, o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. A combinação de solos férteis, clima favorável e infraestrutura tornaram o Sudeste a maior região produtora de etanol no Brasil, sendo responsável por 21% da produção mundial (UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇUCAR - UNICA, 2015; SMEETS et al., 2008). A estimativa é de que na safra de 2022/23 sejam colhidas aproximadamente 596,1 milhões de toneladas de cana no país, sendo o estado

de São Paulo responsável por 50% das áreas cultivadas, com projeção de produção de 301 milhões de toneladas nesta temporada (CONAB, 2022).

A expansão das áreas de cultivo de cana-de-açúcar ocorre principalmente sobre áreas de pastagens degradadas (69,7%), colheitas anuais (25%) e culturas cítricas (1,3%), sendo que na região sudeste do Brasil cerca de 1,5 milhões de hectares de pastagens foram convertidos em canaviais, entre os anos de 2000 e 2009 (ADAMI et al., 2012; FILOSO et al., 2015). Considerando que mais de 50% das áreas de pastagem são degradadas no país (resultado do tratamento extensivo), a conversão dessas áreas em plantações de cana é uma estratégia importante para a reintegração à um sistema mais produtivo, além de evitar o desmatamento de vegetação natural (BORDONAL et al., 2018; COSTA; REHMAN, 1999).

Essa expansão da produção agrícola se mostra muito atraente no Brasil, pois as pastagens cobrem aproximadamente 154,7 milhões de hectares (MAPBIOMAS, 2021). Dessa área total, 38% possuem degradação intermediária, enquanto 14,3% se encontram severamente degradadas (MAPBIOMAS, 2021). A pastagem praticada de forma extensiva se degrada ao longo do tempo e perde sua produtividade, devido a fatores como a escolha inadequada da espécie para cultivo do pasto, falta de correção e adubação do solo, ausência de rodízio de piquetes, taxa de lotação de animais inadequada, prática de queimadas, entre outros (LANGE et al., 2019). Para que ocorra a liberação dessas áreas degradadas para outros usos, ocorre o processo denominado intensificação de pastagens, que consiste no aumento no número de animais por hectare (MACDONALD et al., 2017). A intensificação da produção de ruminantes pode ser alcançada por meio de insumos (sementes, fertilizantes, agrotóxicos, suplementos alimentares), práticas agropecuárias (pastejo rotativo, reformas no solo) e ações gerenciais (controle zootécnico, por exemplo) (ANDRADE; FERREIRA; FARINATTI, 2011; MACDONALD et al., 2017).

Nesse cenário, tanto a intensificação de pastagem quanto a produção em larga escala da cana-de-açúcar vêm acompanhados pelo aumento significativo do uso de fertilizantes e agrotóxicos, resultando em impactos variáveis no solo, ar e água. (FRIMPONG et al., 2018). Desde 2008, o Brasil ocupa a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos, e nos últimos anos também se tornou o principal destino de produtos banidos no exterior (LONDRES, 2011). Além disso, os sistemas agrícolas, tal como a cultura de cana-açúcar, são considerados os principais meios de modificação de ecossistemas, visto que causam a degradação da paisagem, exposição do solo, perda de nutrientes e aporte de materiais e

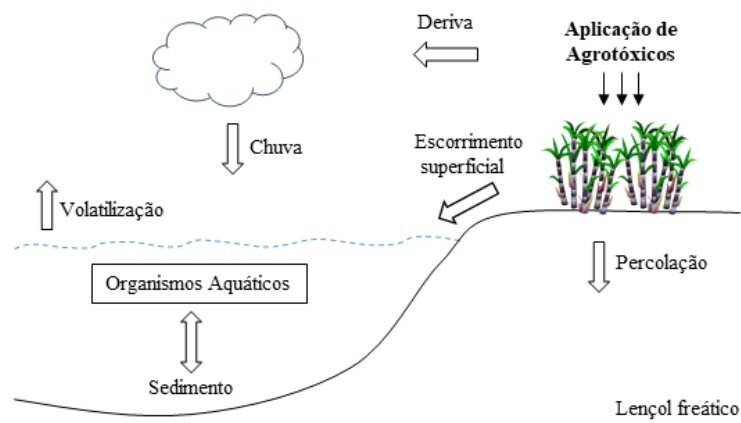
produtos químicos aos corpos hídricos superficiais e subterrâneos (ARMAS, 2006). Portanto, crescem as preocupações acerca dos impactos ambientais frente à expansão crescente da área de cultivo de cana no país, levando à criação de indicadores capazes de avaliar alterações sobre a biodiversidade, água, solo e atmosfera (FILOSO et al., 2015).

2.6 AGROTÓXICOS

As práticas modernas de manejo agrícola são utilizadas com o objetivo de maximizar a produção e reduzir ao máximo as perdas pela presença de organismos indesejados (FRIMPONG et al., 2018). Este cenário levou ao uso amplo de agrotóxicos, os quais persistem e afetam o ambiente em maior extensão do que o pretendido (BHAT et al., 2015). Além de atingirem as espécies nocivas às plantações, estes poluentes são potencialmente tóxicos para organismos não-alvo, podendo causar, mesmo em baixas concentrações, problemas de reprodução e desenvolvimento, mudanças de aparência, comportamento e até morte em espécies de plantas, animais e microrganismos (PATTANASUPONG et al., 2004).

Menos de 0,1% dos agrotóxicos aplicados atingem os organismos alvo, enquanto os 99,9% restantes têm o potencial de atingir organismos não-alvo e outros compartimentos ambientais, tais como os sistemas aquáticos, por meio de deriva (transporte pelo vento), escoamento superficial e lixiviação (MARTINELLI; FILOSO, 2008; YOUNOS; WEIGMANN, 1988). Nos ambientes aquáticos, dependendo das características físico-químicas do contaminante, este pode se ligar ao material particulado em suspensão, se depositar no sedimento ou ser absorvido por organismos presentes no ambiente (PERET et al., 2010). Além disso, são transportados no sistema aquático por difusão nos corpos d'água e podem retornar à atmosfera por volatilização (SILVA; SANTOS, 2007). O esquema da Figura 2 representa o transporte de agrotóxicos no ambiente, até atingirem os ecossistemas aquáticos.

Figura 2 – Representação esquemática do transporte de agrotóxicos no ambiente.



Fonte: Autoria própria

O controle desse tipo de poluição se mostra mais complexo, por se tratar de uma fonte difusa, dependente de diversos fatores, tais como temperatura, interações com outros poluentes, tipo de solo ou sedimento, pluviosidade, pH e salinidade (ALVES; OLIVEIRA-SILVA, 2003). A análise de resíduos de agrotóxicos na água requer diversas etapas e técnicas analíticas, tais como coleta e preparação de amostras, separação e métodos de detecção (ALBUQUERQUE et al., 2016). Portanto, o monitoramento desses produtos nos corpos hídricos inclui tarefas onerosas e de baixo êxito na estimativa real dos riscos e impactos, pois a concentração no ambiente ocorre em picos (influenciados pelas condições ambientais), o que requer a obtenção de várias amostras no tempo e local exatos de ocorrência (ARMAS, 2006).

2.6.1 2,4-D

Entre os agroquímicos utilizados na cultura de cana-de-açúcar está o 2,4-D, segundo ingrediente ativo mais vendido no Brasil, no ano de 2020 (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2021). O composto é um herbicida hormonal sistêmico e atua no aumento da plasticidade da parede celular e da síntese de proteínas e etileno, resultando em divisões celulares descontroladas e em danos ao tecido vascular das plantas (UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA, 2005). Na maioria das condições ambientais, o 2,4-D se torna um composto aniônico, o que aumenta sua dispersão devido à maior mobilidade no solo e em ambientes aquáticos, podendo-se observar efeitos letais e subletais em organismos não-alvo (USEPA, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2010). O 2,4-D é

detectado em corpos d'água na concentração ambiental de 4 a 24 µg/L, podendo chegar a 4000 µg/L em áreas próximas à campos agrícolas (ATAMANIUK et al., 2013; BORGES et al., 2004). Em águas superficiais brasileiras, a maior concentração de 2,4-D encontrada foi de 366,6 µg/L (CETESB, 2018).

Milhorne et al. (2009) avaliaram o potencial de contaminação de águas superficiais por diversos princípios ativos pelo Método de Goss, considerando a meia-vida do contaminante no solo, o coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo e a solubilidade em água. Dentre agrotóxicos estudados, o 2,4-D apresentou baixo potencial de transporte associado ao sedimento em suspensão e médio potencial de transporte dissolvido em água, evidenciando a importância do monitoramento desse composto nos ecossistemas aquáticos.

Em razão de um novo marco regulatório no setor de agrotóxicos, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou uma reclassificação toxicológica dos produtos já registrados no Brasil, no ano de 2019. Nessa nova classificação, os agrotóxicos são identificados por categorias, na qual a Categoria 1 se refere a Produto Extremamente Tóxico e a Categoria 5, Produto Improvável de Causar Dano Agudo. O 2,4-D, na formulação comercial "DMA 806 BR", pertencia à Classe I (Extremamente Tóxico) na classificação anterior, mas atualmente é caracterizado como Produto Pouco Tóxico, pertencente à Categoria 4.

Mesmo em baixas concentrações, o 2,4-D pode provocar efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em plantas, bem como alterações histológicas, fisiológicas e comportamentais em animais (MARCATO; SOUZA; FONTANETTI, 2017). Wong (2000) realizou testes de inibição de crescimento com a alga verde *Scenedesmus quadricauda*, em contato com os herbicidas 2,4-D, glifosato e paraquat em concentrações de 0,02 a 200 mg/L. Em concentrações maiores que 200 mg/L, o 2,4-D causou completa inibição de crescimento, síntese de clorofila *a* e fotossíntese, devido ao efeito negativo do produto sobre os cloroplastos. Já a concentração de 2 mg/L do agrotóxico reduziu a taxa de fotossíntese das algas em cerca de 80%, em relação ao controle.

Martínez-Ruiz e Martínez-Jerónimo (2018) expuseram as espécies *M. aeruginosa* (cianobactéria) e *A. falcatus* (alga) ao 2,4-D em diversas concentrações, por 96h. Um dos resultados obtidos foi a IC₅₀ (Concentração média de inibição da reprodução dos organismos-teste) nos valores de 1353,80 mg/L para a alga e 71,20 mg/L para a cianobactéria. A conclusão dos autores é de que ambos os organismos se mostraram tolerantes a concentrações altas do herbicida, no entanto foram observados efeitos negativos significativos,

principalmente na morfologia celular e no aumento da produção de cianotoxinas sob a condição de *stress* causada pelo agrotóxico.

No estudo de Zhu et al. (2016), embora a exposição da espécie *Scenedesmus obliquus* à uma concentração de 2 mg/L de 2,4-D não tenha causado inibição de crescimento nas algas, observou-se alterações nas defesas morfológicas do organismo, relacionadas ao modo de ação do herbicida. Para peixes da espécie *Cnesterodon decemmaculatus*, Ruiz de Arcaute, Soloneski e Larramendy (2016) constataram a mortalidade de 50% da população quando exposta durante 96h à uma concentração de 1008 mg/L de 2,4-D em formulação comercial.

O estudo de Li et al. (2017) teve como objetivo avaliar a toxicidade do 2,4-D em embriões de peixe da espécie *Danio rerio*, a partir da análise de sobrevivência, eclosão, comprimento corporal, bioacumulação, morfologia do coração e batimentos cardíacos. A exposição foi de 70h, nas concentrações de 25, 40, 50, 60, 75 e 100 mg/L do herbicida. Obtiveram-se CL₅₀ (concentração da amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos) de 46,71 mg/L, IC₅₀ de 46,26 mg/L e mortalidade de 100% dos embriões expostos à concentração de 100 mg/L. O efeito mais comum observado nos organismos foi o edema pericárdico e, além disso, o 2,4-D na concentração mínima analisada (25 mg/L) alterou os níveis de transcrição de vários genes relacionados ao estresse oxidativo e ao coração.

Freitas et al. (2019) analisaram a exposição de três espécies de girinos ao herbicida 2,4-D, em testes agudos e crônicos. Os autores observaram atraso na metamorfose e inibição do crescimento e desenvolvimento dos organismos na concentração de 0,125 mg/L. Além disso, notaram-se efeitos na respiração e na atividade natatória, os quais podem estar relacionados às alterações causadas nos estoques de energia primária (lipídios, proteínas e carboidratos), alocados para processos de desintoxicação. A análise comportamental dos girinos mostrou que a espécie *L. catesbeinus* evitou o 2,4-D, no entanto é incapaz de distinguir concentrações crescentes do produto, podendo se expor a zonas mais contaminadas.

2.6.2 Fipronil

Outro produto amplamente utilizado na cultura de cana-de-açúcar é o fipronil, um inseticida cujo mecanismo de ação consiste no bloqueio do receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA) nos neurônios do sistema nervoso central de insetos, causando hiperexcitação seguida de mortalidade (BLOOMQUIST, 2003; DAS et al., 2006). Quanto à classificação toxicológica de agrotóxicos realizada pela Anvisa, o fipronil na formulação

comercial Regent 800WG pertencia à Classe I (Extremamente Tóxico), porém foi reclassificado como Produto Altamente Tóxico (Categoria 2), no ano de 2019. O composto também é tóxico para vários organismos não-alvo, como peixes, invertebrados aquáticos, abelhas e aves, em concentrações ambientalmente relevantes (USEPA, 1996a).

A maior concentração de fipronil encontrada em águas superficiais brasileiras foi de 465 µg/L (CETESB, 2018). Por meio de revisão bibliográfica, Albuquerque et al. (2016) avaliaram a ocorrência de agrotóxicos em água doce no Brasil e, entre os inseticidas, o fipronil foi o mais frequentemente encontrado, ocorrendo em concentrações de 0,05 a 26,2 µg/L, em 54% das 251 amostras analisadas. No estudo de Beggel et al. (2010), os autores expuseram larvas de peixe da espécie *Pimephales promelas* durante 24h a concentrações subletais de duas formulações comerciais de inseticida, a fim de determinar os efeitos no crescimento e desempenho natatório. O fipronil, em concentrações a partir de 333 µg/L, afetou o crescimento larval dos organismos, cujos efeitos se relacionam às mudanças endócrinas no organismo causadas pelo contaminante. Além disso, o inseticida levou a um comprometimento significativo do desempenho natatório em concentrações a partir de 142 µg/L.

Xu et al. (2018) também avaliaram os efeitos do fipronil em larva de peixe (espécie *Danio rerio*), as quais foram expostas a concentrações de 100 a 1000 µg/L durante 96h, a fim de examinar o efeito letal e os fenótipos de desenvolvimento em altas doses do inseticida. A partir do teste de toxicidade aguda, os autores obtiveram o valor de CL₅₀ de 459 µg/L, observando-se também efeitos anormais no desenvolvimento, tais como coluna vertebral torta e redução no comprimento corporal dos organismos. Para a mesma espécie, Wu et al. (2014) obtiveram uma CL₅₀ de 220,4 µg/L, além da identificação de efeitos subletais em enzimas do peixe.

Moreira et al. (2020) avaliaram os efeitos de água condicionada com cairomônios de peixe, fipronil e 2,4-D, isolados e em mistura, sobre a espécie de cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*. Quando exposta ao fipronil isolado, observaram-se efeitos significativos de redução de fecundidade na concentração de 1,3 µg/L do ingrediente ativo. A combinação de fipronil com a água condicionada causou efeitos sobre o comprimento médio dos organismos maternos e menor produção de neonatas. Já a mistura da água com os dois agrotóxicos causou um declínio nas taxas de sobrevivência e reprodução, indicando que um tóxico pode interferir na tolerância do organismo para o outro.

Silva et al. (2020) avaliaram a toxicidade aguda e crônica de formulações do DMA® 806 BR (2,4-D) e Regent® 800 WG (fipronil), individualmente e em mistura à *Ceriodaphnia silvestrii*. Para os testes agudos individuais, os autores obtiveram valores de $EC_{50\ 48h}$ (concentração efetiva que provoca efeito adverso em 50% dos organismos-teste) de 169 mg/L para 2,4-D e 3,9 µg/L para fipronil. No teste crônico, os valores de $EC_{50\ 8\ dias}$ encontrados para reprodução dos organismos foram de 55 mg/L (2,4-D) e 1,6 µg/L (fipronil). Para os testes de toxicidade aguda (imobilidade) com a mistura dos agrotóxicos, os autores constataram que a interação dos dois agrotóxicos demonstrou antagonismo em baixas doses e sinergismo em altas doses, com a mudança de antagonismo para sinergismo ocorrendo em doses maiores que a EC_{50} . Já para a toxicidade crônica (reprodução), ocorreu antagonismo como resultado da interação do 2,4-D com o fipronil.

Pinto et al. (2021) avaliaram as implicações funcionais de concentrações ambientais do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil (individuais e em mistura) ao quironomídeo tropical nativo *Chironomus sancticaroli*. Nos testes de toxicidade individuais com 2,4-D não foi observado efeito sobre a reprodução das larvas, enquanto para o fipronil os autores obtiveram $EC_{50\ 48h}$ igual a 3,7 µg/L e constataram que todas as concentrações de teste subletais diminuíram o crescimento larval, causando reduções na biomassa até 72%. A concentração mais alta de 2,4-D testada (426 µg/L) diminuiu a largura da cápsula cefálica dos organismos, mas o desenvolvimento larval não foi afetado em todas as concentrações avaliadas do herbicida. Nos testes de mistura, os autores observaram, para o crescimento das larvas, antagonismo em concentrações mais baixas e sinergismo em concentrações mais altas de fipronil.

No ambiente, o fipronil é degradado por oxirredução, hidrólise e fotólise, formando quatro metabólitos principais: fipronil sulfona (por oxidação próxima à superfície do solo), fipronil sulfide (por redução nos solos), fipronil amida (por hidrólise na água e nos solos) e fipronil desulfenil (por fotólise) (AAJOUND; RAVANEL; TISSUT, 2003). Em uma das etapas do estudo de Aajoud, Ravanel e Tissut (2003), os autores avaliaram a toxicidade dos produtos da degradação do fipronil através de ensaios com larvas de quarto instar de *Aedes aegypti*. Para fipronil sulfide e sulfona o valor de CL_{50} encontrado foi de 3,79 µg/L, enquanto para fipronil desulfenil e fipronil amida os valores obtidos foram 29,7 µg/L e 57,5 µg/L, respectivamente.

Devido à sua baixa solubilidade em água (2,40 mg/L à 25°C e pH = 9) espera-se que o fipronil esteja associado ao sedimento de ambientes aquáticos, onde habitam e se alimentam os organismos bentônicos (GRIPP et al., 2017; GUNASEKARA et al., 2007). Analisando a toxicidade aguda do composto de macroinvertebrados aquáticos, Ali, Nayar e Gu (1998) encontraram $CL_{50} = 0,42 \mu\text{g/L}$ para a espécie bentônica *Chironomus crassicaudatus*. Já Weston e Lydy (2014) também abordaram os produtos da degradação do fipronil nos testes de toxicidade, definindo-se para o *Chironomus dilutus* $CL_{50} \geq 0,08 \mu\text{g/L}$ (fipronil), $CL_{50} > 0,06 \mu\text{g/L}$ (fipronil sulfide) e $CL_{50} > 0,10 \mu\text{g/L}$ (fipronil sulfona).

2.7 VINHAÇA

Efeitos negativos também podem ser observados na fertirrigação da cultura da cana com vinhaça. A aplicação do produto em larga escala é uma alternativa efetiva em termos de economia e fertilização no cultivo da cana-de-açúcar, dados os níveis elevados de cálcio, potássio e matéria orgânica em sua composição, além de nitrogênio e outros nutrientes (PRADO; CAIONE; CAMPOS, 2013). Porém, a vinhaça apresenta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) que varia entre 20.000 a 35.000 mg/L e possui a maior carga poluidora entre os efluentes líquidos da indústria sucroalcooleira, sendo seu uso intensivo capaz de modificar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e da água (FERREIRA et al., 2011; SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). Caso a dosagem não seja devidamente mensurada, é provável que ocorra a saturação do solo, causando um aumento do escoamento superficial e lixiviação de íons (principalmente nitrato e potássio), de modo que haja contaminação dos corpos d'água mais próximos (MARINHO et al., 2014; SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

A fim de analisar a magnitude do impacto dessa contaminação no ecossistema aquático, Botelho et al. (2012) constataram alta toxicidade da vinhaça bruta (pH ~ 4) em espécies de diferentes níveis de organização biológica (*C. dubia*, *D. magna* e *D. rerio*), com CL_{50} de 0,67%, 0,80% e 2,26%, respectivamente. No estudo de Marinho et al. (2014), os autores observaram que todos os indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) morreram após 48h de exposição a diluições de vinhaça de 5 e 10%, devido à redução de oxigênio na água decorrente da carga orgânica elevada da amostra. Em experimentos com a mesma espécie de peixe, além da mortalidade de 100% da população exposta à diluição de 10% de vinhaça, Correia et al. (2016) também avaliaram mudanças morfológicas no tecido

branquial e aumento significativo de células mucosas para todas as diluições testadas (1%, 2,5%, 5% e 10%).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa consiste em avaliar a qualidade da água e os efeitos ecotoxicológicos decorrentes das práticas de manejo do solo em pastagens extensivas, pastagens intensivas e cana-de-açúcar, utilizando três espécies não-alvo como bioindicadoras - *Ceriodaphnia silvestrii*, *Eruca sativa* e *Chironomus sancticaroli*, - por meio de experimentos em modelos ecossistêmicos (mesocosmos), considerando a variação temporal entre duas coletas: janeiro/2020 e agosto/2020.

Para isso, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- i. Caracterizar as variáveis diárias do tempo (precipitação, temperatura do ar, velocidade do vento e radiação solar) nas duas coletas realizadas, a fim de entender como estas variáveis podem ter influenciado os resultados obtidos;
- ii. Analisar a variação do compartimento abiótico nos mesocosmos nas duas coletas, por meio das medidas das variáveis físicas, químicas e biológicas, identificando se as práticas de manejo têm influência sobre elas;
- iii. Quantificar a ocorrência do herbicida DMA® 806 BR (2,4-D) e do inseticida Regent® 800 WG (fipronil) nos mesocosmos, a fim de estimar quanto dos agrotóxicos aplicados no solo foram transportados para o corpo hídrico;
- iv. Analisar os efeitos ecotoxicológicos decorrentes das práticas de manejo do solo em pastagens extensivas, pastagens intensivas e cana-de-açúcar a partir de duas coletas de água e sedimento dos mesocosmos, utilizando *Ceriodaphnia silvestrii* (consumidor primário) como espécie representativa do contato direto com a água contaminada (habitat); *Eruca sativa* (produtor primário) como espécie representativa do contato indireto com a água contaminada (irrigação); e *Chironomus sancticaroli* (consumidor primário) como espécie representativa da qualidade do sedimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO E MODELO EXPERIMENTAL

A área de estudo (Figura 3) está localizada na cidade de Brotas-SP, em uma das fazendas experimentais selecionadas para o projeto temático denominado “*Environmental effects of the pasture-sugarcane and pasture intensification*” (Processo FAPESP n° 2015/18790-3). De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é subtropical mesotérmico (Cwa). A pluviosidade média anual é de 1300 mm, com maior precipitação no verão (novembro a março) e menor no inverno (abril a setembro) (ARGENTON, 2004).

O modelo experimental possui 5 réplicas de 0,25 ha (50x50m) com três tipos de uso e ocupação do solo: pasto extensivo (PE), pasto intensivo (PI) e cana-de-açúcar (C), com um mesocosmo inserido em cada unidade, totalizando 15 unidades experimentais (8 m de comprimento, 1 m de profundidade e 1,5 m de largura). Os mesocosmos foram impermeabilizados por uma manta geotêxtil (especificação: GF 07) seguida de uma geomembrana de polietileno de alta densidade (PEAD) lisa, com espessura de 0,5 mm. As unidades foram preenchidas com água de poço artesiano (9 m³), e 10 cm de solo local foi adicionado no fundo para exercer a função de sedimento. Posteriormente, foram introduzidas três espécies de macrófitas (*Salvinia auriculata*, *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes*).

A alocação de cada tipo de tratamento do solo (PE, PI e C) levou em consideração a declividade do terreno, de forma que pelo menos um de cada ficasse próximo à área de Cerrado adjacente (Figura 3). Como no tratamento C há aplicação de maior quantidade de agroquímicos, este foi instalado na parte mais baixa do terreno, de modo a reduzir as interferências decorrentes do escoamento superficial nos tratamentos PE e PI. Além disso, foram construídas estradas entre as áreas PE/PI e PI/C, de forma a isolar os tratamentos.

Para auxílio dos experimentos, os mesocosmos foram nomeados em PE, PI e C e numerados conforme o modelo experimental da Figura 3. Os resultados para os *plots* indicados com “X” nos tratamentos C e PE não foram apresentados, em decorrência da presença de animais, adjacentes à área experimental, que rasgaram a manta plástica, ocasionando o vazamento da água e, conseqüentemente, a perda destas unidades experimentais.

Figura 3 – Representação esquemática do modelo experimental inserido na fazenda experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) em Brotas-SP



Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar. Os *plots* indicados com “X” não foram analisados neste estudo.

Fonte: Autoria própria

A espécie de pasto plantada no tratamento PI foi a *Brachiaria brizantha* cv *marandu*, amplamente utilizada no Brasil e escolhida por sua melhor produtividade e qualidade nutricional (CEZÁRIO et al., 2015; EUCLIDES et al., 2014). O pasto que já estava estabelecido na área experimental (*Brachiaria decumbens*) foi mantido no tratamento PE, uma vez que nenhum tipo de manejo de solo foi realizado neste tratamento. O cultivo da cana-de-açúcar foi do tipo “cana de ano-e-meio” (cana de 18 meses), e a variedade utilizada foi a IAC SP 97-4039.

A pastagem de gado (raça Nelore) para o consumo da forragem produzida foi simulada nas áreas de PE e PI. A capacidade de carga das pastagens foi estimada considerando unidade animal (UA) de 450 kg e consumo diário de 4% do peso vivo, a fim de não comprometer a produtividade e a resistência das pastagens (DIAS-FILHO, 2014; EUCLIDES et al., 2014). Nesta fase, todos os mesocosmos e os diferentes tratamentos foram cercados com uma cerca de arame e uma cerca elétrica para evitar o contato do gado com os mesocosmos, e sua transição entre os tratamentos. Em outubro de 2020 foi realizado o corte da cana-de-açúcar e posterior adubação para a próxima safra.

A aplicação de fertilizantes foi simulada nos tratamentos PI e C, assim como a aplicação do herbicida DMA® 806 BR (2,4-D, Dow AgroSciences Industrial Ltda.), enquanto

o inseticida Regent® 800 W G (fipronil, BASF S.A.) foi aplicado somente no tratamento C (Tabela 1). No tratamento C, os *plots* C4 e C5 foram fertirrigados com vinhaça (Tabela 2), na proporção de 0,40 L de vinhaça/metro linear, além da complementação com fertilizante para atingir a concentração de NPK indicada para a cultura da cana-de-açúcar (Tabela 1). É importante ressaltar que, além da aplicação nas linhas da cana-de-açúcar nesses *plots*, a vinhaça também foi aplicada no interior dos mesocosmos C4 e C5, a fim de simular a chegada desse produto nos ecossistemas aquáticos. Já nos *plots* C1 e C2, foi aplicado somente o fertilizante NPK.

Tabela 1 - Concentração de fertilizantes (NPK) e agrotóxicos aplicados nos tratamentos PI e C

Agroquímico	Unidade	PE	PI	C
N		-	103	155
P	kg ha ⁻¹	-	32	18
K		-	67	71
2,4-D	L PC ha ⁻¹	-	1,5	1,5
Fipronil	g PC ha ⁻¹	-	-	500

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; PC – produto comercial.

Fonte: Autoria própria

Tabela 2 – Caracterização físico-química da vinhaça bruta utilizada neste estudo

Parâmetro	Unidade	Valores
pH	-	4,0
Densidade	g mL ⁻¹	1,0
Carbono total	g L ⁻¹	35,6
Sólidos voláteis	g L ⁻¹	22,8
Sólidos totais	g L ⁻¹	23,6
Sólidos fixos	g L ⁻¹	0,8
Nitrogênio total	g L ⁻¹	1,4
Fósforo total	g L ⁻¹	0,2
Potássio (K)	g L ⁻¹	8,5
Cálcio (Ca)	g L ⁻¹	2,0
Magnésio (Mg)	g L ⁻¹	0,9
Enxofre (SO ₄)	g L ⁻¹	2,3
Cobre (Cu)	mg L ⁻¹	0,8
Zinco (Zn)	mg L ⁻¹	1,5
Manganês (Mn)	mg L ⁻¹	13,3
Ferro (Fe)	mg L ⁻¹	29,8
Sódio (Na)	mg L ⁻¹	73,3

Fonte: Autoria própria

A Figura 4 representa fotos aéreas dos tratamentos de solo (pastagem extensiva, pastagem intensiva e cana-de-açúcar), e a estrutura de uma unidade experimental (mesocosmo). As etapas de manejo do solo realizadas em cada tratamento estão descritas na Tabela 3.

Figura 4 – Fotos aéreas das unidades de tratamento (esquerda) e mesocosmo (direita) na fazenda experimental de Brotas-SP.



Fonte: Mazzi (2019)

Tabela 3 – Caracterização dos principais eventos ocorridos nos tratamentos de pastagem extensiva, pastagem intensiva e cana-de-açúcar durante dois ciclos de cana-de-açúcar

Ciclo	Etapas de manejo do solo	Tratamento	Período
1	Gradagem e calagem	PI e C	Outubro/2018
	Aragem	C	Outubro/2018
	Aplicação de fertilizantes (NPK)	PI e C	Outubro/2018
	Plantio da cana	C	Novembro/2018
	Plantio do pasto	PI	Novembro/2018
	Aplicação do agrotóxico fipronil	C	Dezembro/2018
	Aplicação do agrotóxico 2,4-D	PI e C	Janeiro/2019
	Pastagem do gado	PE e PI	Abril-Maio/2019
2	Corte da cana	C	Outubro/2019
	Aplicação de NPK nas regiões de PI e C	PI e C	Outubro/2019
	Aplicação da vinhaça da cana-de-açúcar	C	Novembro/2019
	Aplicação do agrotóxico fipronil	C	Novembro/2019
	Aplicação do agrotóxico 2,4-D	PI e C	Dezembro/2019
	Pastagem do gado	PE e PI	Dez/2019-Jan/2020
	Corte da cana	C	Outubro/2020

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria

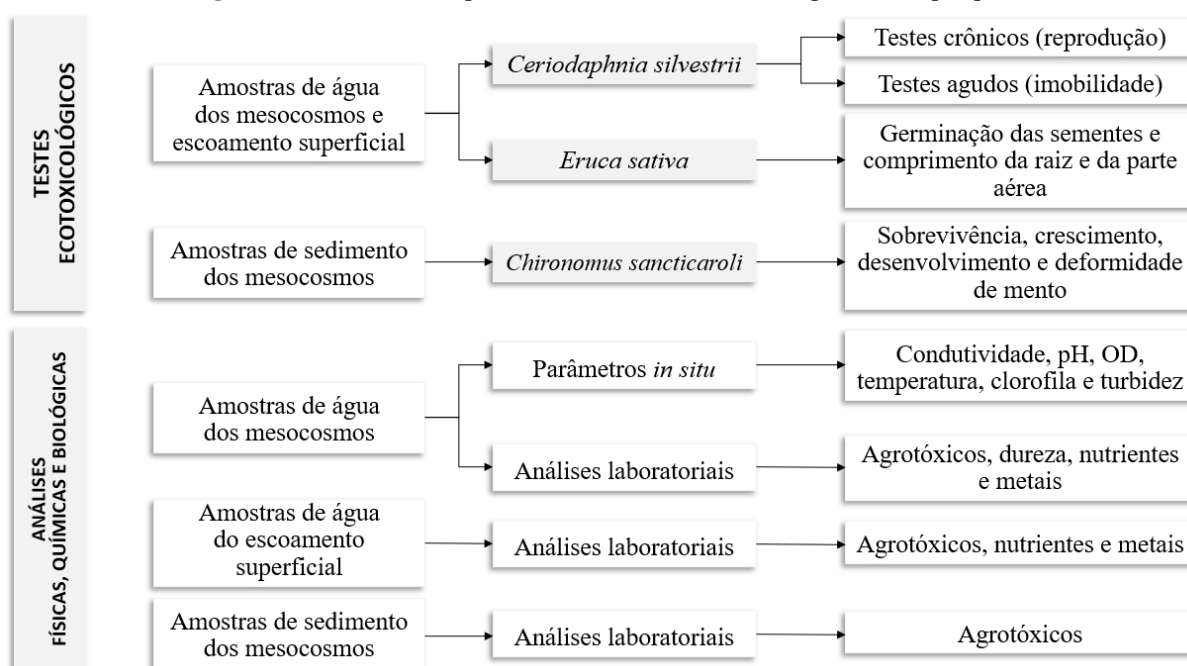
4.2 CARACTERIZAÇÃO CLIMATOLÓGICA

Os resultados das variáveis climatológicas foram obtidos na Estação Climatológica do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA/EESC/USP), localizada em Itirapina-SP, considerando que esta era a estação mais próxima da área de estudo em Brotas. Para a caracterização climatológica foram consideradas as medidas diárias de precipitação, temperatura do ar (mínima, máxima e média), velocidade do vento a 2,00 m de altura e radiação solar.

4.3 ABORDAGEM EXPERIMENTAL DA PESQUISA

A Figura 5 apresenta uma síntese do desenho experimental realizado durante o período de estudo, contemplando os testes ecotoxicológicos em laboratório e as análises físicas, químicas e biológicas.

Figura 5 – Síntese dos experimentos realizados durante o período da pesquisa



Fonte: Autoria própria

4.4 AMOSTRAGEM E ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

As amostras de água dos mesocosmos foram coletadas com um auxílio de um balde, armazenadas em garrafas plásticas não tóxicas, e transportadas em isopor para os respectivos laboratórios responsáveis pelas análises de dureza, de nutrientes, quantificação de agrotóxicos

e de metais. As análises de dureza e nutrientes foram realizadas no laboratório de Limnologia do CRHEA/EESC/USP, cujos métodos de análise estão descritos na Tabela 4. Além disso, algumas variáveis físicas e químicas da água dos mesocosmos foram determinadas por medições *in loco*, incluindo pH, temperatura, oxigênio dissolvido (OD), saturação do OD, condutividade elétrica e turbidez, por meio de uma sonda multiparâmetros (YSI Pro DSS). As concentrações de clorofila foram determinadas ainda em campo, utilizando o equipamento AquaFluor® Turner Designs.

Tabela 4 – Métodos de análises das amostras de água em laboratório

Parâmetro	Método	Referência
Dureza	Titulometria	(NBR 12621, 1995)
Nitrito e nitrato	Espectrofotometria	(MACKERETH et al., 1978)
Íon amônio	Espectrofotometria	(KOROLEFF, 1976)
Nitrogênio orgânico total	Espectrofotometria	(APHA, 1995)
Fósforo total dissolvido e fosfato inorgânico	Espectrofotometria	(GOLTERMAN; CLYMO; OHNSTAD, 1978)
Fósforo total	Espectrofotometria	(APHA, 1995)
Silicato reativo	Espectrofotometria	(GOLTERMAN, CLYMO; OHNSTAD, 1978)

Fonte: Autoria própria

As amostras de água coletadas para quantificação dos agrotóxicos (2,4-D e fipronil) foram encaminhadas para o Laboratório de Química Ambiental (Instituto de Química da Unicamp). As análises foram realizadas em parceria com a Profa. Dra. Cassiana C. Montagner, utilizando equipamento de cromatografia líquida Agilent 1200 acoplado à espectrometria de massas em tandem (Agilent 6410) (Agilent Technologies-Santa Clara, EUA). O método utilizado para quantificação dos agrotóxicos, bem como os limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), veracidade, precisão e efeito matriz foram descritos detalhadamente por Goulart et al. (2020).

As amostras coletadas para análise de metais foram submetidas à digestão ácida para extração dos metais (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA, 1995) no laboratório de Limnologia do CRHEA/EESC/USP e armazenadas em recipientes de vidro envoltos de papel alumínio para preservação da amostra. A quantificação dos metais foi realizada em parceria com a Profa Dra Janaina Braga do Carmo (Universidade Federal de São Carlos – Campus Sorocaba), por meio de espectroscopia de emissão atômica por plasma de

micro-ondas (MP-AES 4200, Agilent Technologies), para quantificar as concentrações de Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Sr, Zn e K. O coeficiente de correlação de cada curva de calibração analítica foi maior do que 0,995, e o erro de calibração máximo de 12%. Os comprimentos de onda (nm) usados na análise e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) (HAGE; CARR, 2012) estão listados na Tabela 5. Todos os reagentes usados tinham alta taxa de pureza e seu teor de metais traço foi verificado. As calibrações analíticas foram realizadas utilizando solução padrão multielementar (Agilent Technologies). As análises foram feitas em quintuplicata, controlando os resultados analíticos por meio da análise das soluções padrões concomitantemente com a análise das amostras.

Tabela 5 – Comprimento de onda da análise de metais pelo MP-AES, e seus limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

Elemento	Comprimento de Onda (nm)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Al	396.152	$8,2 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$
Ba	455.403	$1,5 \times 10^{-8}$	$4,7 \times 10^{-8}$
Cd	228.802	$8,4 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$
Co	340.512	$2,4 \times 10^{-6}$	$7,4 \times 10^{-6}$
Cr	425.433	$2,4 \times 10^{-7}$	$7,2 \times 10^{-7}$
Cu	324.754	$6,4 \times 10^{-8}$	$2,0 \times 10^{-7}$
Mn	403.076	$8,1 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$
Mo	379.825	$2,2 \times 10^{-7}$	$6,8 \times 10^{-7}$
K	766.491	$7,4 \times 10^{-7}$	$22,2 \times 10^{-7}$
Ni	352.454	$4,5 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-6}$
Sr	407.771	$1,0 \times 10^{-8}$	$3,1 \times 10^{-8}$
Zn	213.857	$7,4 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-6}$

Notas: LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.

Fonte: Autoria própria

As amostras do escoamento superficial foram coletadas em janeiro/2020, e fazem parte de um projeto de pós-doutorado incluído no projeto temático (GOMES, T.F. – bolsista PNPd/CAPES). As amostras foram coletadas a partir da instalação de coletores automáticos (modelo ISCO 6712) na parte mais baixa dos *plots* PE1, PI1 e C1, localizados na mesma direção e próximos a área de mata nativa (ou seja, com declividade e área de entorno semelhante). Este sistema consegue coletar amostras em tempo pré-determinados e de acordo com as variações nas vazões do escoamento. Após coleta, as amostras foram armazenadas em

refrigerador e utilizadas para os ensaios de toxicidade e análises de nutrientes, quantificação de agrotóxicos e metais, pelos mesmos métodos descritos anteriormente. Essa abordagem foi incluída no presente estudo a fim de comparar a qualidade da água do escoamento superficial com a dos mesocosmos.

As coletas de sedimento foram realizadas com o auxílio de um *core sampler*, constituído de um tubo de PVC com 10 cm de diâmetro, que permite obter amostras relativamente não perturbadas e consolidadas do sedimento. As amostras também foram encaminhadas para o Laboratório de Química Ambiental (Instituto de Química da Unicamp) para a quantificação de agrotóxicos. No laboratório, as amostras de sedimento foram inicialmente secas ao ar em condições ambiente e peneiradas em peneiras com tamanho de partículas de 1,0 mm. Em seguida, 10 g da amostra foram adicionadas a tubos Falcon de 50 mL e acidificadas com 1 mL de ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹. A extração por SLE foi realizada em dois ciclos de 10 minutos empregando-se 20 mL de diclorometano por ciclo. A cada ciclo, a mistura foi homogeneizada em Vortex por 1 minuto, sonicada por 10 min em banho ultrassônico e em seguida, a fase orgânica foi separada por centrifugação a 4000 rpm por 10 min. Ao final de cada ciclo a fase orgânica foi coletada e seca sob fluxo constante de nitrogênio a 22 C°. O extrato seco foi ressuspense em 1,5 mL de uma mistura MeOH-H₂O 70:30 v/v contendo 50 µg L⁻¹ de 2,4-D (anel ¹³C₆) e fipronil-(pirazol-¹³C₃, ciano-¹³C) utilizados como padrão interno. Em seguida, o extrato foi filtrado empregando filtro de seringa de PTFE hidrofóbico (0,45 µm) (AMARANTE et al., 2003; TETZNER et al., 2016). Quando necessário, os extratos foram diluídos em uma mistura H₂O-MeOH 70:30 v/v para posterior análise por LC-MS/MS empregando padronização interna.

4.4.1 Índice do Estado Trófico (IET) dos mesocosmos

O Índice do Estado Trófico (IET) tem por finalidade classificar corpos d'água em diferentes graus de trofia, avaliando a qualidade da água quanto ao enriquecimento por nutrientes e seu efeito relacionado ao crescimento excessivo das algas e cianobactérias (CETESB, 2019a). Para a determinação do IET seguiu-se a metodologia utilizada pela CETESB para a classificação dos corpos d'água do Estado de São Paulo, especificamente reservatórios, uma vez que os mesocosmos se assemelham a esse sistema (lênticos). O cálculo é composto pelo Índice do Estado Trófico para o fósforo – IET(PT), e o Índice do Estado

Trófico para a clorofila *a* – IET(Cl *a*), modificados por Lamparelli (2004), segundo as equações:

$$IET (Cl a) = 10 \times (6 - ((0,92 - 0,34 \times (\ln Cl a)) \div \ln 2)) \quad (\text{Equação I})$$

$$IET (PT) = 10 \times (6 - ((1,77 - 0,42 \times (\ln PT)) \div \ln 2)) \quad (\text{Equação II})$$

$$IET = [IET(PT) + IET(Cl a)] \div 2) \quad (\text{Equação III})$$

Em que:

IET = Índice do Estado Trófico;

Cl *a* = clorofila *a* (µg/L);

PT = Fósforo total (µg/L);

ln = logaritmo natural.

Os limites estabelecidos para as diferentes classes de trofia dos rios e as características para cada faixa de IET estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Classificação do estado trófico para rios a partir da faixa de IET (Índice de Estado Trófico)

IET	Faixas	Característica
Ultraoligotrófico	$IET \leq 47$	Corpos d'água limpos, de produtividade muito baixa e concentrações insignificantes de nutrientes que não acarretam em prejuízos aos usos da água.
Oligotrófico	$47 < IET \leq 52$	Corpos d'água limpos, de baixa produtividade, em que não ocorrem interferências indesejáveis sobre os usos da água, decorrentes da presença de nutrientes.
Mesotrófico	$52 < IET \leq 59$	Corpos d'água com produtividade intermediária, com possíveis implicações sobre a qualidade da água, mas em níveis aceitáveis, na maioria dos casos.
Eutrófico	$59 < IET \leq 63$	Corpos d'água com alta produtividade em relação às condições naturais, com redução da transparência, em geral afetados por atividades antrópicas, nos quais ocorrem alterações indesejáveis na qualidade da água decorrentes do aumento da concentração de nutrientes e interferências nos seus múltiplos usos.
Supereutrófico	$63 < IET \leq 67$	Corpos d'água com alta produtividade em relação às condições naturais, de baixa transparência, em geral afetados por atividades antrópicas, nos quais ocorrem com frequência alterações indesejáveis na qualidade da água, como a ocorrência de episódios florações de algas, e interferências nos seus múltiplos usos.
Hipereutrófico	$IET > 67$	Corpos d'água afetados significativamente pelas elevadas concentrações de matéria orgânica e nutrientes, com comprometimento acentuado nos seus usos, associado a episódios florações de algas ou mortandades de peixes, com conseqüências indesejáveis para seus múltiplos usos, inclusive sobre as atividades pecuárias nas regiões ribeirinhas.

Adaptado de CETESB (2019a) e Lamparelli (2004)

4.5 TESTES DE TOXICIDADE

Os testes ecotoxicológicos para avaliação da toxicidade aguda e crônica foram realizados no laboratório do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA-EESC-USP), a partir das amostras de água coletadas diretamente dos mesocosmos e do escoamento superficial. As espécies utilizadas como bioindicadores foram o microcrustáceo *Ceriodaphnia silvestrii*, a espécie vegetal *Eruca sativa* e o macroinvertebrado bentônico *Chironomus sancticaroli*.

4.5.1 Testes de toxicidade com *Ceriodaphnia silvestrii*

O cultivo de *C. silvestrii* foi obtido no NEEA/CRHEA/EESC/USP a partir de culturas com idades sincronizadas mantidas em béqueres de 1 L com água reconstituída filtrada com pH entre 7,0-7,6, condutividade elétrica de 160 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e dureza de 40-48 mgCaCO_3/L , como recomendado pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM, 2001). As culturas foram mantidas em fotoperíodo de 12h:12h (claro:escuro), a 25°C, com renovação de água três vezes por semana (ABNT, 2017). Os organismos foram alimentados com uma mistura composta por ração microfloculada de alevinos de peixe (TetraMin®) e fermento tipo Fleishman (1mL/L⁻¹), e suspensão algácea de *R. subcapitata* cultivadas em meio LC-Oligo com uma concentração de aproximadamente 6×10^4 células/L.

Os testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados segundo as recomendações da norma NBR 13373:2017 (ABNT, 2017) e metodologia utilizada por Silva et al. (2020). Os testes de toxicidade aguda avaliam a imobilidade dos organismos e foram realizados no período de 48h, em quadruplicata e com cinco neonatas (6 – 24 h de idade) em cada réplica, alocados em copos plásticos com capacidade de 50 mL, contendo 10 mL de solução-teste. O experimento foi validado caso as amostras do controle laboratorial apresentassem mortalidade abaixo de 10%. Já no teste crônico o efeito observado foi a inibição da reprodução. O teste teve duração de oito dias, foi realizado em quintuplicata, com aproximadamente 15 mL das amostras coletadas, e um organismo por recipiente teste (6 – 24 h de idade). Os organismos foram alimentados e mantidos sob as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e meio descritas para o cultivo. Os testes foram semi-estáticos, com renovação das amostras e da alimentação a cada dois dias. O teste foi validado com mortalidade inferior a 20% dos organismos adultos no grupo controle.

Em ambos os experimentos, foram aferidos os seguintes parâmetros físico-químicos: pH (pH-metro Micronal B374), condutividade (condutivímetro Orion modelo 145A+) e oxigênio dissolvido (YSI 55), no início e final para o teste agudo, e início, final e a cada troca de solução para o teste crônico. Com o intuito de garantir que os organismos utilizados nos experimentos estavam em boas condições fisiológicas, foram realizados testes de sensibilidade mensalmente no laboratório, seguindo a norma NBR 13373:2017 (ABNT, 2017).

A Tabela 7 sintetiza os requisitos para os ensaios de toxicidade agudos e crônicos.

Tabela 7 – Síntese das condições de ensaio para os testes agudos e crônicos com a espécie *C. silvestrii*

Parâmetro	Teste crônico	Teste agudo
Organismo-teste	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	
Idade dos neonatas	6 a 24h	
Ensaio	Semiestático	
Temperatura	25 ± 2°C	
Iluminação	1000 lux	
Fotoperíodo	12C:12E	
Alimentação	15 µL de ração e 30 µL de alga	
Período de exposição	8 dias	48 h
Volume das soluções	15 mL	10 mL
Número de réplicas por recipiente-teste	5	4
Número de organismos por recipiente-teste	1	5
Renovação da solução-teste	Duas renovações com intervalo de dois a três dias	Não
Endpoint	Reprodução e sobrevivência	Imobilidade
Parâmetros medidos	Condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido	

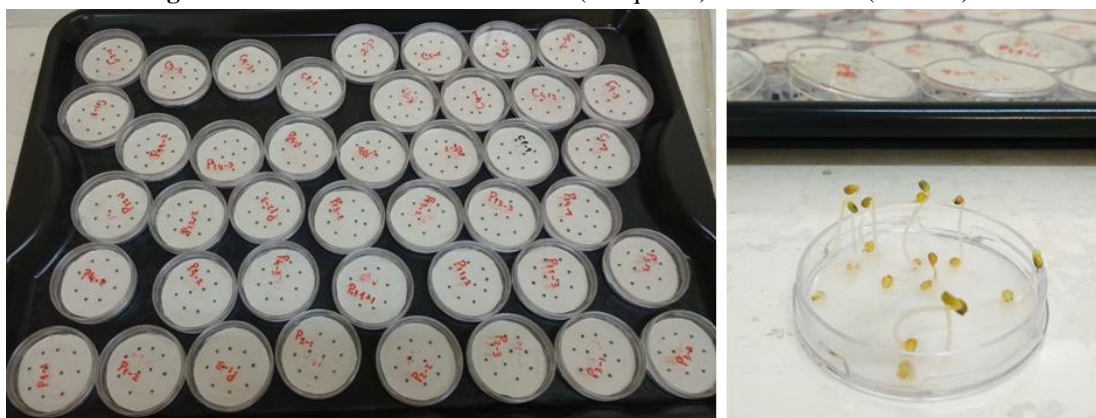
Fonte: Adaptado de ABNT (2017)

4.5.2 Teste de toxicidade com *Eruca sativa*

Os testes de germinação com a espécie *Eruca sativa* (rúcula) foram realizados de acordo com a norma EPA 712-C-96-154 da *The United States Environmental Protection Agency* (US-EPA, 1996a). As sementes utilizadas nos testes foram de rúcula folha larga gigante (Isla Sementes®, média de germinação 92%). Os testes foram realizados em placas de

Petri com papel filtro, nas quais foram dispostas 10 sementes de *E. sativa* (Figura 6). Em seguida adicionou-se 1 mL da amostra de água coletada e os recipientes foram dispostos em câmara escura, à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ pelo período de 96 h. O teste foi feito em triplicata, e os *endpoints* avaliados foram a germinação das sementes e o comprimento da parte aérea e das raízes. Adotou-se a porcentagem mínima de 70% de germinação das sementes do grupo controle para validação do teste.

Figura 6 – Início do teste com *E. sativa* (à esquerda) e fim do teste (à direita)



Fonte: Autoria própria

4.5.3 Testes de toxicidade com *Chironomus sancti-caroli*

As larvas de *Chironomus sancti-caroli* foram obtidas de culturas alocadas no laboratório do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA/EESC/USP). Os organismos foram mantidos em bandejas plásticas, contendo 1 kg de areia comercial lavada e calcinada (550°C por 2h) e 4L de água de cultivo (pH: 7-7,5, condutividade $50,5 \pm 1,4$ $\mu\text{S}/\text{cm}$; dureza 12-16 mg/L CaCO_3), com aeração constante, em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h:12h (claro:escuro) (FONSECA; ROCHA, 2004). A água de cultivo consistiu em água natural obtida em poço profundo (60m), localizado no CRHEA/EESC/USP com pH de 6,2-6,6, condutividade de 25-30 $\mu\text{S}/\text{cm}$, dureza de 8,0 mg/L CaCO_3 e OD de 7-7,5 mg/L. As larvas foram alimentadas três vezes por semana, com 25 mL de solução de ração para peixe TetraMin® (5 mg/L). Além disso, foram realizadas limpezas semanais das paredes das bandejas, renovação da água quinzenal e acompanhamento dos parâmetros físico-químicos da água (pH, OD, temperatura e condutividade), sendo as bandejas descartadas a cada 30 dias. Os organismos utilizados nos testes foram obtidos a partir da montagem de novas bandejas com larvas recém-eclodidas, para garantia da idade no primeiro instar de desenvolvimento (4 a 5 dias) e o período de exposição foi de oito dias para evitar

metamorfose (PINTO et al., 2021), de acordo com o ciclo de vida descrito em Fonseca e Rocha (2004).

Os testes de toxicidade subcrônicos com a espécie foram realizados em triplicata em potes de plástico não-tóxicos de 200 mL, com amostras de sedimento dos mesocosmos (100 mL), 175 mL de água de cultivo e 10 organismos em cada réplica. O controle foi realizado em quadruplicata com areia esterilizada fina (60g), água de cultivo (240 mL) e 10 organismos por réplica. A cada 48h foi realizada a aeração da água e alimentação das larvas (1,5 mL de TetraMin®). A aeração da água foi realizada com compressor de ar Boyu, o qual borbulha ar delicadamente sem ressuspender o sedimento, pelo tempo de 30 segundos em cada réplica, exceto no grupo controle. O objetivo dos testes foi avaliar os efeitos subletais dos contaminantes na fase larval do ciclo de vida do organismo, observando-se os *endpoints* de sobrevivência, crescimento (comprimento corporal e biomassa), desenvolvimento (largura da cápsula cefálica) e deformidades de mento. Os testes foram considerados válidos se a sobrevivência no grupo controle foi superior a 80%. Foram aferidos os seguintes parâmetros físico-químicos no início, meio e final do teste: pH (pH-metro Micronal B374), condutividade (condutivímetro Orion modelo 145A+) e oxigênio dissolvido (YSI 55).

Ao fim do teste, os organismos foram conservados em álcool isopropílico para posterior montagem de lâminas semipermanentes em meio de Hoyer. O crescimento foi determinado pelo comprimento corporal das larvas, medidas com auxílio do software *Kinovea* 0.8.15, o qual foi calibrado a partir de fotos dos organismos juntos ao papel milimetrado, conforme um dos modelos ilustrados na Figura 7. O comprimento do corpo do organismo foi determinado como uma linha do topo da cabeça até as papilas anais (PINTO et al., 2021).

Figura 7 – Lâmina com *C. sancticaroli* e papel milimetrado para posterior medição do comprimento corporal dos organismos

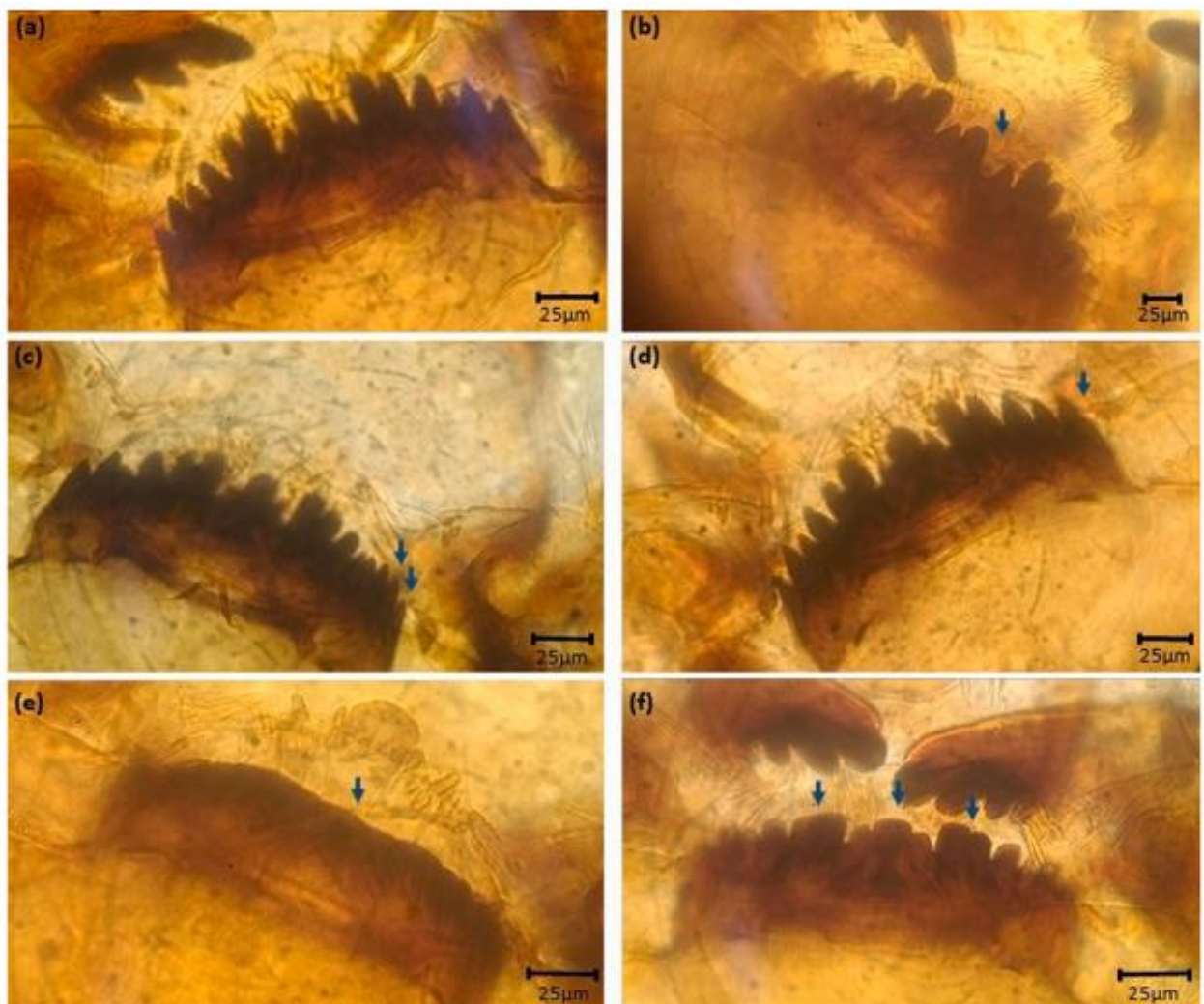


Fonte: Autoria própria

Pós-fotografadas, as cápsulas cefálicas das larvas foram removidas do corpo e colocadas em lâminas semi-permanentes com o meio de Hoyer para a observação da estrutura

bucal em um microscópio óptico (LEICA DMLS) em ampliação de 200 vezes, a fim de verificar as deformidades de mento. Foram consideradas quatro tipos de deformidades com base em Bonani (2010), Kuhlmann, Hayashida e Araújo (2000) e Pinto et al. (2021): Köehn *gap*, falta de dentes, excesso de dentes e bifurcação do dente central mediano, conforme exemplificado na Figura 8. Dentes desgastados foram registrados como alteração de larvas não deformadas, e a quebra de dentes não foi considerada como deformidade, pois poderia ser resultado do manuseio dos organismos, e não da má formação. A frequência de ocorrência de deformidade foi calculada pela relação entre o número de larvas com deformidade e o número total de organismos expostos em cada tratamento (BISTHOVEN; TIMMERMANS; OLLEVIER, 1992).

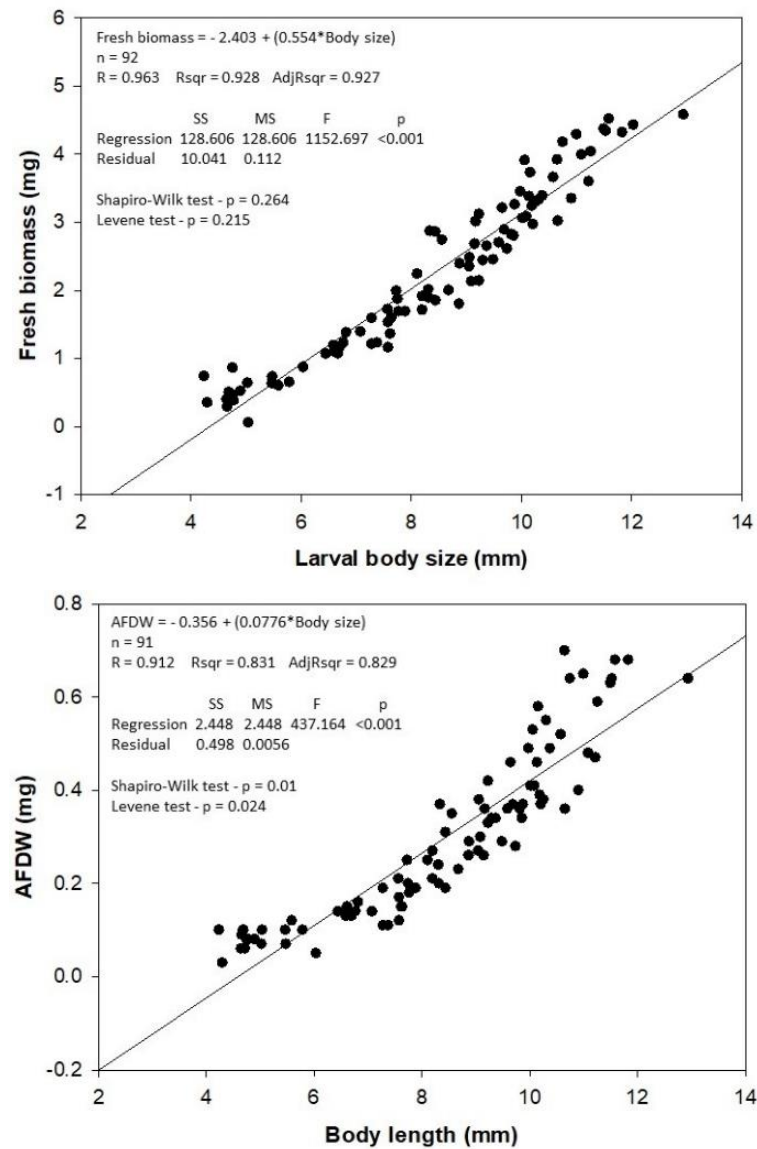
Figura 8 – Exemplos de deformidades de mento em larvas do gênero *Chironomus*: em A – estrutura normal do mento, B – Köehn *gap*, C – excesso de dentes; D – falta de dentes; E – ausência de dentes; F – dentes desgastados.



Fonte: Pinto et al. (2021)

A biomassa fresca e a biomassa seca livre de cinzas (AFDW) dos organismos foram estimadas por meio de um modelo de regressão linear estabelecido para os cultivos da espécie no NEEA, o qual relaciona a biomassa com o comprimento do corpo das larvas medido nos testes de toxicidade. O modelo está descrito na Figura 9.

Figura 9 – Regressão linear para o comprimento corporal, biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas (AFDW) de *C. sancticaroli*.



Fonte: Pinto et al. (2021)

A largura da cápsula cefálica foi medida em microscópio estereoscópico e aplicado para a determinação do instar de desenvolvimento das larvas, de acordo com Fonseca e Rocha (2004), conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Largura da cápsula cefálica e tempo de duração em condições normais dos quatro instares de desenvolvimento para a espécie *Chironomus sancticaroli* cultivada com Tetramin®

Instar de desenvolvimento	Largura da cápsula cefálica	Dias de duração
I	0,085-0,10	4
II	0,150-0,161	2
III	0,258-0,266	2
IV	0,42-0,46	5

Fonte: Adaptado de Fonseca e Rocha (2004)

A Tabela 9 sintetiza as condições do teste de toxicidade com *C. sancticaroli*.

Tabela 9 – Síntese das condições de ensaio para os testes subcrônicos com a espécie *C. sancticaroli*

Parâmetro	Teste de toxicidade
Organismo-teste	<i>C. sancticaroli</i>
Temperatura	25°C
Iluminação	100 a 1000 lux
Fotoperíodo	12C:12E
Volume de sedimento	100 mL
Volume de água	175 mL
Idade dos organismos	Final do Instar I
Número de organismos	10
Número de réplicas por recipiente-teste	3
Alimentação	1,5 mL (TetraMin®) a cada 48 h
Aeração	A cada 48h
Duração	8 dias
Endpoints	Sobrevivência, crescimento (comprimento corporal, biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas), desenvolvimento (largura da cápsula cefálica) e deformidades de mento
Parâmetros medidos	Condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido

Fonte: Autoria própria

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros físico-químicos foram analisados a partir da análise de componentes principais (*Principal Component Analysis – PCA*), em parceria com o Prof. Dr. Paulo José Duarte-Neto, do Departamento de Estatística e Informática, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (professor colaborador do Projeto Temático). A PCA qual consiste em uma técnica estatística de análise multivariada que transforma linearmente um conjunto original de variáveis, inicialmente correlacionadas entre si, num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas, contendo a maior parte da informação do conjunto original (HONGYU; SANDANIELO; OLIVEIRA JUNIOR, 2015). Esta análise é uma das maneiras utilizadas para ordenar os dados e reduzir a dimensionalidade de dados multivariados, por meio da álgebra de matrizes (GOTELLI; ELLISON, 2016).

A PCA gera um número de eixos igual ao número de variáveis, em que o Eixo 1 (X) contém a maior quantidade de variação nos dados (chamado eixo maior) e o Eixo 2 (Y) com a próxima maior quantidade de variação nos dados, e assim por diante (GOTELLI; ELLISON, 2016). Os resultados desta pesquisa foram analisados a partir dos dois primeiros eixos (X e Y), pois representam a maioria da variância envolvida nos dados. A PCA foi realizada por meio do software estatístico R versão 4.0.0 (R CORE TEAM, 2020) com o aplicativo Rstudio versão 1.2.5042 © 2009-2020, utilizando o pacote “FactoMineR” (LÊ; JOSSE; HUSSON, 2008). Em seguida, a quantidade de carga e o coeficiente de pontuação de cada fator foram transformados graficamente para visualização usando o pacote “factoextra” (KASSAMBARA; MUNDT, 2020).

A PCA permite a identificação e avaliação das fontes de variação espacial (poluição de origem antropogênica) e temporal (sazonalidade climática) que afetam a qualidade da água (VEGA et al., 1998). Na presente pesquisa, esta análise avaliou comparações entre os pontos de coleta de cada tratamento de solo (pasto de baixa intensidade, pasto de alta intensidade e cana-de-açúcar) quanto às variáveis físico-químicas, separadas em grupos: parâmetros medidos *in situ*, nutrientes, metais e agrotóxicos. Para a análise, utilizou-se o valor das variáveis de cada *plot*, possibilitando a interpretação em termos de pasto extensivo (PE), pasto intensivo (PI) e cana-de-açúcar (C).

As análises estatísticas dos testes de toxicidade foram realizadas também na versão R 3.6.0 (2009) com o software estatístico R versão 4.0.0 (R CORE TEAM, 2020) e o aplicativo Rstudio versão 1.2.5042 © 2009-2020. Todas as comparações dos tratamentos com o grupo

de controle foram realizadas nível de confiança de 95% ($p = 0,05$), usando Modelos Lineares Generalizados (GLM) (FIGUEIRÊDO et al., 2020; LOPES et al., 2018; SCHERER et al., 2020). Os efeitos sobre sobrevivência e mortalidade dos organismos foram analisados pela GLM com a família Binomial e função de ligação *logit*, enquanto os outros endpoints foram determinadas pela GLM com a família Gaussiana e a função de ligação *identity*.

A fim de relacionar as variáveis físico-químicas aos *endpoints* obtidos nos testes de toxicidade, utilizou-se a Análise de Redundância (RDA – *Redundancy Analysis*). Esta análise foi desenvolvida por Rao (1973) e se baseia em medidas de distância euclidiana e combinações lineares entre variáveis explicativas e dependentes, podendo ser utilizada como um método de ordenação de dados de qualidade da água sob influência de usos do solo (ZEILHOFER; LIMA; LIMA, 2006). O objetivo da RDA, portanto, é maximizar o relacionamento entre esses grupos de variáveis através de sua ordenação direta (SABA, 2011). A análise e a padronização foram realizadas por meio do software Canoco versão 4.5.6 (ANDERSON; TER BRAAK, 2003). Cabe ressaltar que a RDA foi realizada apenas com os *endpoints* de *C. silvestrii* e *E. sativa*, que foram as espécies testadas com as amostras de água dos mesocosmos. Assim como na PCA, os resultados foram analisados a partir dos dois primeiros eixos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

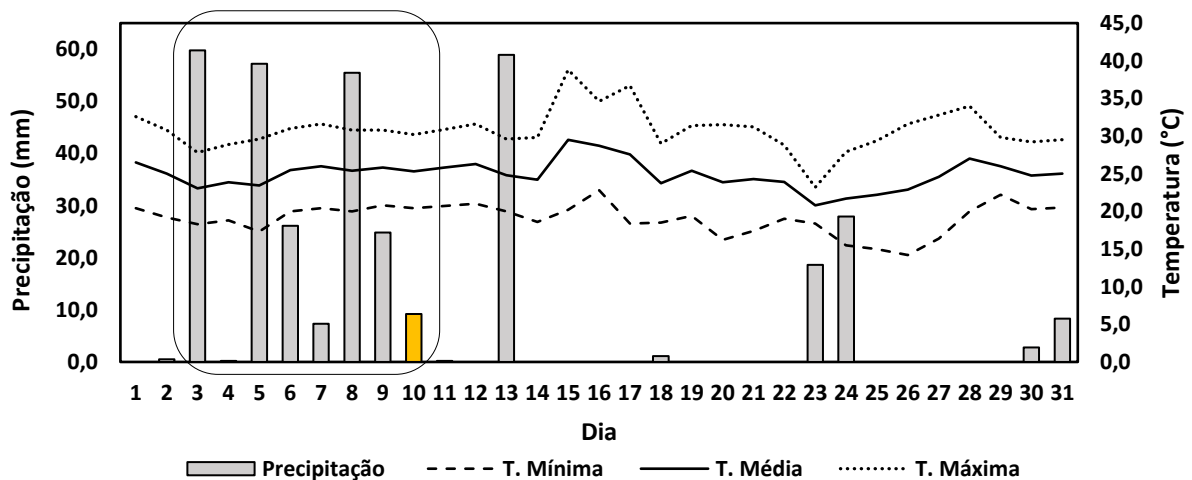
5.1 CARACTERIZAÇÃO CLIMATOLÓGICA

Neste tópico estão descritas as medições das variáveis climatológicas, obtidas na Estação do CRHEA/EESC/USP, a qual foi selecionada por ser a mais próxima da área experimental.

5.1.1 Precipitação e temperatura do ar

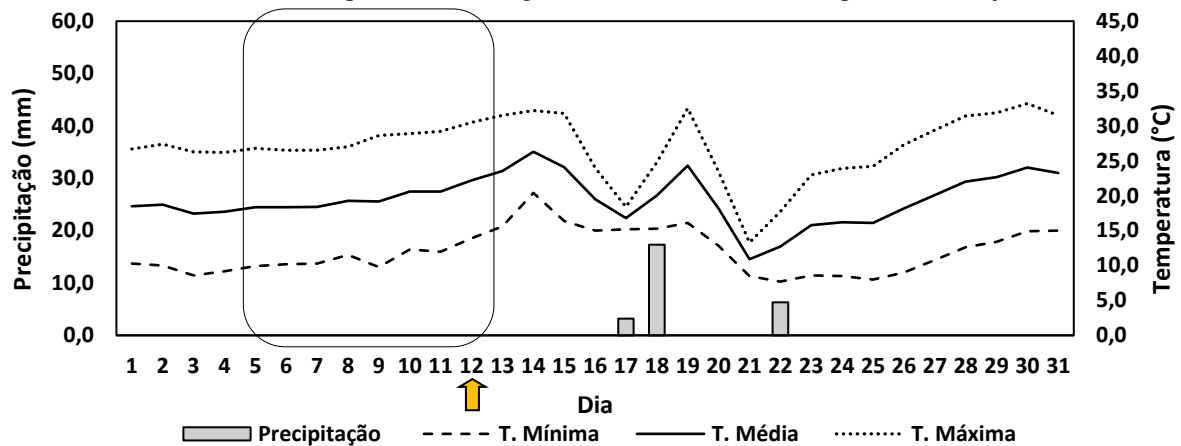
Na Figura 10 e na Figura 11 estão apresentados os dados de precipitação e temperatura do ar (mínima, máxima e média), medidas no mês de janeiro e agosto/2020, respectivamente. Os sete dias antecedentes à coleta estão delimitados pela forma retangular, e os dias da coleta (10 de janeiro e 12 de agosto/2020) estão destacados em laranja. Para janeiro, observa-se que a semana da coleta apresentou valores de precipitação elevados, com destaque para os dias 3 (59,8 mm), 5 (57,2 mm) e 8 (55,5 mm). Quanto à temperatura do ar, nota-se que se manteve aproximadamente constante, com uma média de 24,8°C entre os dias 3 e 10 de janeiro. Já para agosto, conforme o clima esperado para essa região em meses de inverno, observa-se a ausência de chuva nas duas semanas antecedentes à coleta. A temperatura do ar apresentou um pequeno aumento neste período, com uma média de 19,6°C, entre os dias 5 e 12 de agosto. A menor temperatura registrada nessa semana foi de 9,8°C, no dia 9 de agosto, e a maior foi de 30,5°C, no dia 12.

Figura 10 – Precipitação e temperatura do ar medidas durante o mês de janeiro/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma retangular, e dia da coleta em laranja)



Fonte: Autoria própria

Figura 11 – Precipitação e temperatura do ar medidas durante o mês de agosto/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma retangular e dia da coleta indicado pela seta laranja)

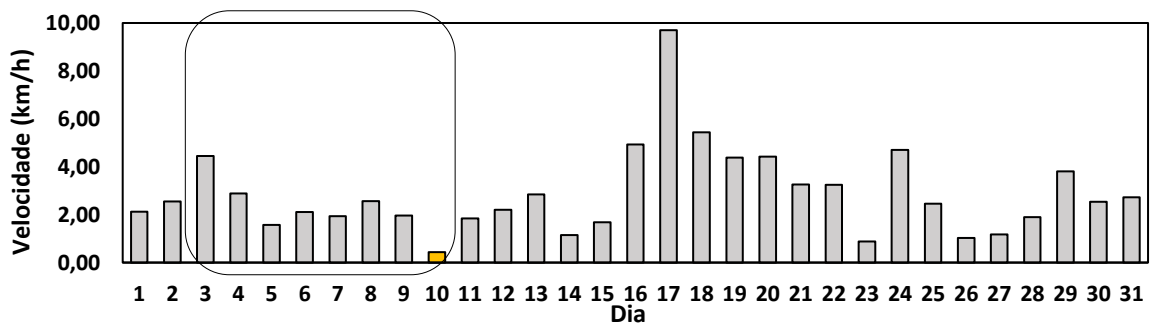


Fonte: Autoria própria

5.1.2 Velocidade do vento

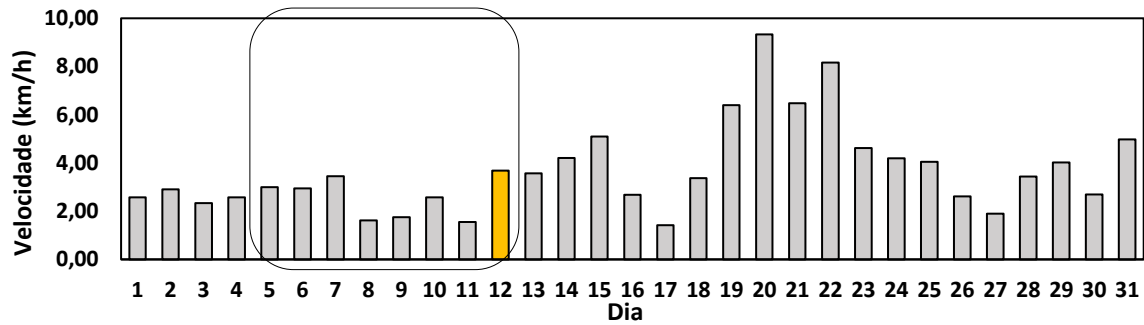
A Figura 12 e a Figura 13 apresentam os dados de velocidade do vento medidos diariamente nos meses de janeiro e agosto, respectivamente. Na semana antecedente à coleta, a média da velocidade foi de 2,24 km/h em janeiro, e 2,57 km/h em agosto. Entre os dias 3 e 10 de janeiro, o maior valor registrado foi de 4,44 km/h. Já no período de 5 a 12 de agosto, a maior velocidade ocorreu no próprio dia da coleta, com ventos a 3,68 km/h.

Figura 12 – Velocidade do vento (km/h) a 2 m de altura medida durante o mês de janeiro/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma retangular, e dia da coleta em laranja)



Fonte: Autoria própria

Figura 13 – Velocidade do vento (km/h) a 2 m de altura medida durante o mês de agosto/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma retangular, e dia da coleta em laranja)

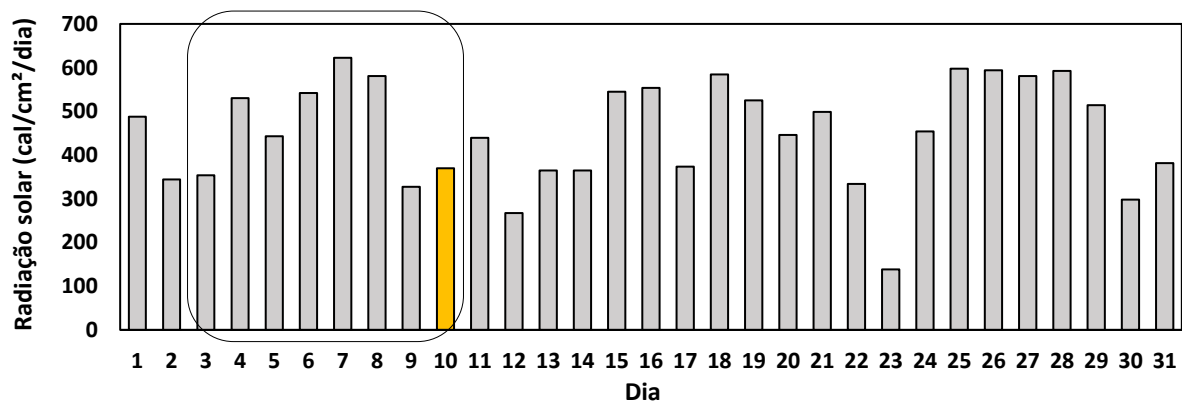


Fonte: Autoria própria

5.1.3 Radiação solar

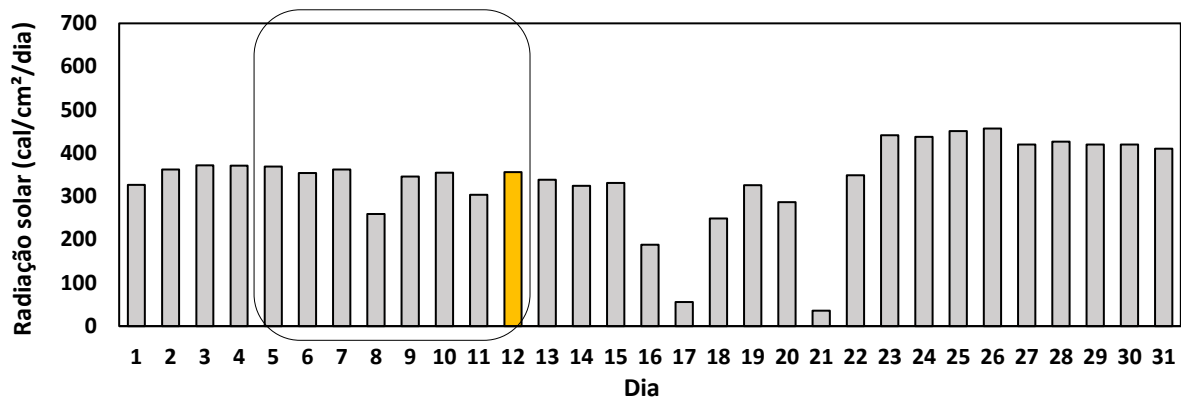
A Figura 14 e a Figura 15 apresentam os dados de radiação solar medidos diariamente nos meses de janeiro e agosto, respectivamente. Na semana antecedente à coleta, a média da radiação foi de 471 cal/cm²/dia em janeiro, e 338 cal/cm²/dia em agosto, coincidindo com as temperaturas registradas no mesmo período. Os maiores valores de radiação medidos foram de 622,5 e 369 cal/cm²/dia nos dias 7 de janeiro e 5 de agosto, respectivamente.

Figura 14 – Radiação solar (cal/cm²/dia) medida durante o mês de janeiro/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma e dia da coleta em laranja)



Fonte: Autoria própria

Figura 15 – Radiação solar (cal/cm²/dia) medida durante o mês de agosto/2020 (semana antecedente à coleta destacada pela forma e dia da coleta em laranja)



Fonte: Autoria própria

5.2 ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS (JANEIRO/2020)

Neste tópico estão descritos os resultados das análises físicas, químicas e biológicas, referentes à coleta realizada em janeiro/2020.

5.2.1 Parâmetros medidos *in loco*

A Tabela 10 refere-se aos diferentes tratamentos e contém os resultados das variáveis físicas, químicas e biológicas das amostras de água dos mesocosmos, coletadas no dia 10 de janeiro de 2020. Importante ressaltar que em 11 dos 13 mesocosmos as concentrações de oxigênio dissolvido estiveram abaixo de 2 mg/L, o que a princípio poderia ser um fator de estresse importante para a manutenção das comunidades aquáticas.

Tabela 10 – Variáveis físicas, químicas e biológicas (clorofila) da água dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05

Variável	Tratamento																Valor estabelecido para águas doces na CONAMA 357 (BRASIL, 2005)
	PE1	PE2	PE3	PE4	$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	PI1	PI2	PI3	PI4	PI5	$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	C1	C2	C4	C5	$\bar{X}_C \pm \sigma$	
Temperatura (°C)	25,5	24,4	25,1	25,2	25,1±0,5	24	23,9	24	24,4	23,5	24,0±0,3	24,6	24,4	24,7	24,7	24,6±0,1	-
pH	6,2	5,6	5,6	6,0	5,9±0,3	6,0	6,0	6,3	6,0	6,6	6,2±0,3	6,2	6,0	5,8	5,6	5,9±0,2	6 a 9
Condutividade (µS/cm)	6,4	7,8	7,6	10,2	8,0±1,6	15,3	8,9	35,1	15,5	76,8	30,3±27,8	20,6	8,6	13,7	9,9	13,2±5,4	<100
OD (mg/L)	3,3	0,5	0,2	0,2	1,0±1,5	0,4	0,6	0,2	0,4	0,1	0,3±0,2	0,3	0,5	2,4	0,5	0,9±1,0	≥6 (Classe 1), ≥5 (Classe 2), ≥4 (Classe 3), ≥2 (Classe 4)
% saturação de OD	40,8	5,6	1,8	2,5	12,7±18,8	4,3	7,4	2,0	4,8	0,9	3,9±2,5	3,7	5,8	28,2	5,9	10,9±11,6	-
Turbidez (UNT)	3,1	3,6	2,5	2	2,8±0,7	1,7	3,0	1,0	1,7	48,4	11,2±20,8	13,8	3,3	2,1	2,8	5,5±5,6	<40 (Classe 1), <100 (Classe 2 e 3)
Clorofila a (µg/L)	3,2	9,7	5,3	0,9	4,8±3,8	4,6	7,7	7,2	8,9	3,8	6,4±2,2	7,2	35,1	19,1	7,3	17,2±13,2	<10 (Classe 1), <30 (Classe 2), <60 (Classe 3)
Clorofila b (µg/L)	16	16,8	6,3	4,6	10,9±6,3	6,2	16,1	5,6	7,4	8,2	8,7±4,3	7,4	43,0	13,6	14,1	19,5±15,9	-
Dureza (mgCaCO₃/L)	3,0	4,0	4,0	4,0	3,8±0,5	8,0	5,0	8,0	7,0	8,0	7,2±1,3	7,0	4,0	7,0	4,0	5,5±1,7	-

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; OD – oxigênio dissolvido; \bar{X} - média; σ – desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

O pH influencia os ecossistemas aquáticos naturais através de efeitos diretos sobre a fisiologia de diversas espécies e, indiretamente, pode contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos, como metais pesados, ou exercer efeitos sobre a solubilidade dos nutrientes (CETESB, 2020). A faixa de pH estabelecida para proteção da vida aquática é de 6 a 9 (BRASIL, 2005), portanto 5 das 13 amostras se mostraram abaixo do valor (PE2, PE3, PI2, C4 e C5), porém próximas do limite.

A condutividade elétrica depende das concentrações iônicas e da temperatura e indica a quantidade de sais existentes na coluna d'água, aumentando à medida que se adicionam sólidos dissolvidos (CETESB, 2020). Esta variável representa uma medida indireta da concentração de poluentes e, no geral, níveis superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ indicam ambientes impactados (CETESB, 2020). O maior valor encontrado nesta coleta foi de 76,8 $\mu\text{S}/\text{cm}$ no *plot* PI5, assim, todas as amostras encontram-se dentro do padrão estabelecido pela CETESB. A condutividade depende de vários fatores e pode auxiliar no reconhecimento de impactos nos corpos hídricos, tal como lançamento de efluentes industriais, sanitários, mineração, entre outros (BAGGIO; FREITAS; ARAÚJO, 2016). No presente estudo houve apenas aporte de agrotóxicos e fertilizantes para o interior dos mesocosmos, por isso provavelmente a concentração atendeu ao valor máximo estabelecido por legislação.

O OD é um fator limitante para manutenção da vida aquática e de processos de autodepuração em sistemas aquáticos, e as concentrações mínimas estabelecidas para águas doces de classes 1, 2, 3 e 4 são, respectivamente: 6, 5, 4 e 2 mg/L O₂ (BRASIL, 2005). Dentre as amostras coletadas, apenas a dos mesocosmos PE1 (3,3 mg/L) e C4 (2,4 mg/L) se mostraram dentro do limite para a classe 4, a qual permite apenas uso para navegação e harmonia paisagística. As demais amostras estão abaixo de 2 mg/L, apresentando condição de hipoxia (baixa concentração de oxigênio dissolvido na água), impactando na manutenção da vida dos organismos presentes no ambiente aquático. Esse fato esteve muito associado ao aumento da biomassa de macrófitas aquáticas, as quais praticamente “fecharam” toda a área superficial dos mesocosmos. O fechamento dos mesocosmos pelas plantas contribui para a redução da luminosidade e, com isso, reduz-se também a atividade fotossintética, diminuindo a produção de oxigênio (TUNDISI; TUNDISI, 2016). Ao mesmo tempo em que se reduz a produção, o aumento da matéria orgânica gera consumo de OD associado à decomposição (TUNDISI; TUNDISI, 2016). Em ecossistemas aquáticos, a decomposição das macrófitas gera detritos orgânicos que se acumulam no sedimento, os quais serão novamente

transformados em nutrientes pelas bactérias, com alto consumo de oxigênio dissolvido no processo (HULL; PARRELLA; FALCUCCI, 2008). Vale ressaltar que as macrófitas aquáticas foram introduzidas nos mesocosmos em 2018, assim, pode-se considerar que na época do presente estudo provavelmente estava ocorrendo a decomposição das plantas, ocasionando a queda do OD nos mesocosmos.

A clorofila *a* também é indicadora da biomassa fitoplanctônica, ou seja, do crescimento de algas e cianobactérias devido ao enriquecimento por nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (CETESB, 2014). Portanto, a clorofila quantificada nos mesocosmos pode ser indicativo da decomposição das macrófitas, que causaram aumento na concentração de nutrientes a serem assimilados pelas algas e, conseqüentemente, aumento dos valores de clorofila. Apesar do crescimento das algas, foram constatadas baixas concentrações de OD, provavelmente relacionada com a taxa de respiração (consumo), que se encontrava superior à da produção de oxigênio em determinados períodos do dia.

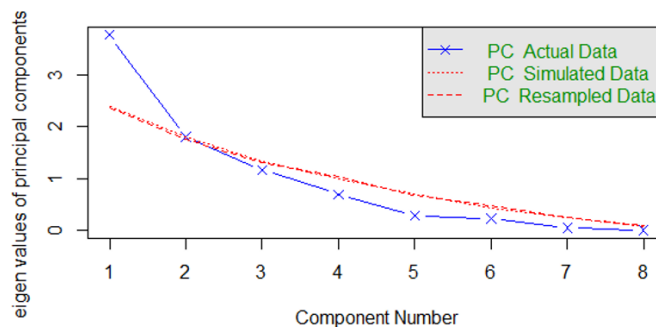
Por ser um dos pigmentos responsáveis pela fotossíntese, a clorofila *a* é também considerada a principal variável indicadora de estado trófico dos ambientes aquáticos (CETESB, 2020). Os valores máximos estabelecidos para águas doces de Classes 1, 2 e 3 são, respectivamente: 10, 30 e 60 µg/L (BRASIL, 2005). Importante destacar que os *plots* da cana-de-açúcar apresentaram maiores valores de clorofila *a*, sendo que as amostras dos mesocosmos C2 (35,1 µg/L) e C4 (19,1 µg/L) se enquadram apenas na Classe 3, enquanto as demais apresentaram concentrações menores que 10 µg/L. O fato de o tratamento C ter recebido fertilização com vinhaça (tanto no solo quanto diretamente no mesocosmos C3, C4 e C5) e NPK provavelmente contribuiu para o maior carreamento de nutrientes para o interior dos mesocosmos, favorecendo a produção de algas e, conseqüentemente, o aumento na concentração de clorofila. Quanto ao Índice de Estado Trófico dos mesocosmos, este será tratado nos próximos tópicos.

Por fim, a turbidez representa o grau de atenuação de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessar uma amostra de água devido à presença de sólidos em suspensão. A Resolução CONAMA nº357/2005 estabelece os limites máximos de 40 e 100 UNT para águas doces de classes 1 e 2, respectivamente. O maior valor encontrado foi de 48,4 UNT no mesocosmo do *plot* PI5, sendo o único a não se enquadrar à legislação para a Classe 1. O mesocosmo PI5 possuía uma biomassa de macrófitas muito elevada, assim, o próprio conteúdo de matéria orgânica fina das macrófitas pode ter contribuído para o aumento na

carga de sólidos em suspensão, elevando a turbidez da água. Para as demais variáveis analisadas não há padrão estabelecido por legislação.

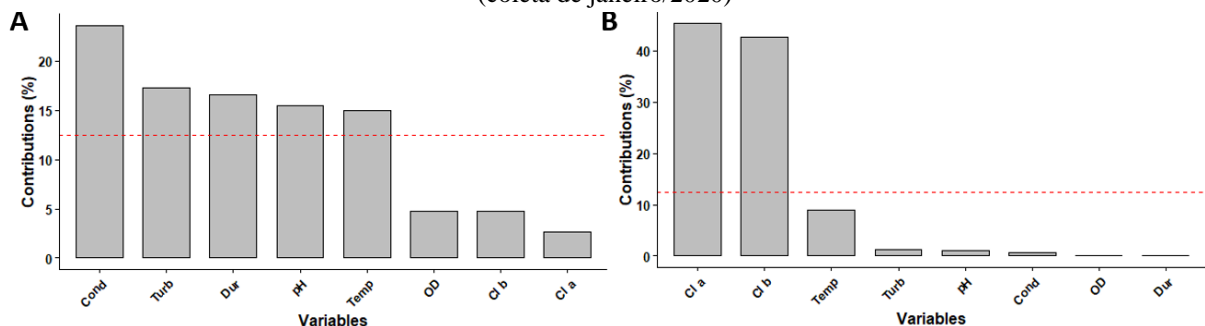
A Figura 18 apresenta a Análise de Componentes Principais (PCA) para os parâmetros físicos, químicos e biológicos medidos *in loco* nos mesocosmos durante a coleta de janeiro/2020. A Figura 16 auxilia na interpretação da PCA, mostrando, que os dois primeiros componentes principais são mais significativos para explicar os dados. A Figura 17 mostra contribuições de cada variável da PC1 e PC2, e a linha vermelha corresponde ao valor esperado se a contribuição fosse uniforme, sendo que para uma dada dimensão, qualquer linha ou coluna com uma contribuição abaixo da linha de referência pode ser considerada tão importante quanto as demais na contribuição da dimensão. Os eixos 1 e 2 explicam, respectivamente, 47 e 22,6% da variância dos dados, totalizando 69,6%.

Figura 16 – Gráfico de análise dos parâmetros *in situ* que reteve os dois primeiros componentes principais como mais significativos para explicar os dados (coleta de janeiro/2020)



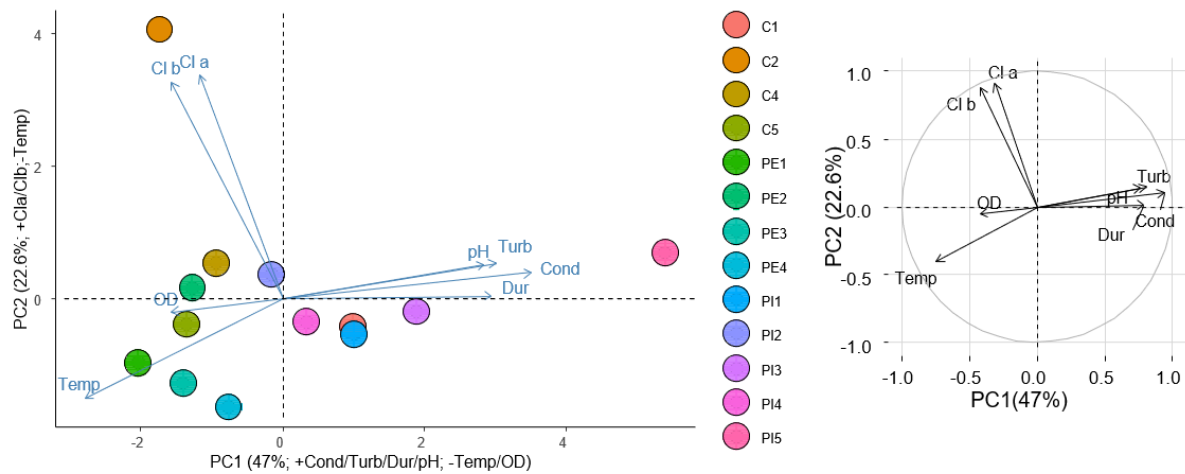
Fonte: Autoria própria

Figura 17 – Contribuições das variáveis (%) para PC1 (A) e PC2 (B). As variáveis analisadas foram condutividade, dureza, temperatura, clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl *b*), pH, oxigênio dissolvido (OD) e turbidez (coleta de janeiro/2020)



Fonte: Autoria própria

Figura 18 – Diagrama da PCA para as variáveis físicas, químicas e biológicas medidas *in loco* nos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de janeiro/2020)



Fonte: Autoria própria

Os mesocosmos estabelecidos nos *plots* C1, PI1, PI3, PI4 e PI5 apresentam os maiores valores associados ao pH, dureza, condutividade e turbidez. Os demais mesocosmos inseridos na matriz da cana-de-açúcar apresentaram comportamentos diversos, com o C2 associado à clorofila *a* e *b*, e C5 com menor relação às variáveis explicativas. As amostras do PE apresentaram valores baixos para as variáveis tanto do eixo 1 quanto do eixo 2, coincidente aos eventos ocorridos na área experimental, uma vez que nesta área não foram aplicados produtos agroquímicos. Também pode-se observar que a temperatura esteve mais relacionada ao PE (terceiro quadrante do gráfico), provavelmente devido à menor cobertura do solo presente nos *plots* desse tratamento em relação ao pasto intensivo e cana-de-açúcar.

5.2.2 Agrotóxicos em amostras de água e sedimento dos mesocosmos

Na Tabela 11 são apresentados os resultados da quantificação de agrotóxicos em cada mesocosmo, considerando 2,4-D, fipronil e os produtos gerados pela degradação do fipronil (fipronil sulfide e fipronil sulfona), os quais são transformados no ambiente por processos de oxidação e redução e podem ser ainda mais tóxicos que o composto original (LIN et al., 2009). Beeler e Schlenk (2001) estabeleceram a seguinte ordem crescente de toxicidade para os produtos da degradação, baseada em estudo com alguns invertebrados: fipronil amida, fipronil desulfenil, fipronil sulfona e fipronil sulfide. Fipronil sulfona e fipronil sulfide são, respectivamente, 6,6 e 1,9 vezes mais tóxicos para invertebrados aquáticos do que o composto original (US-EPA, 1996b).

Conforme o esperado, as maiores concentrações de agrotóxicos foram registradas no local da aplicação, cana-de-açúcar e pasto intensivo no caso do 2,4-D; e cana-de-açúcar no

caso do fipronil. Nos tratamentos de cana-de-açúcar, os valores de 2,4-D foram significativamente maiores, evidenciando a influência do tipo de cobertura do solo no transporte dos agrotóxicos. A presença de agrotóxicos nas amostras de água deste estudo simula uma situação real de contaminação que ocorre devido à expansão da atividade agrícola, principalmente de monoculturas. Além disso, é evidenciada a retenção de agrotóxicos nos corpos d'água. Freitas et al. (2021) avaliaram a retenção e toxicidade do 2,4-D ao longo de um riacho por meio de uma adição controlada do herbicida, constatando a retenção do mesmo ao longo do trecho através do decaimento de 50% da concentração após 317 e 514 metros. Neste cenário, o uso de agrotóxicos é um caso de externalidade negativa, tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente (SOARES; PORTO, 2007).

Tabela 11 – Quantificação de agrotóxicos na água dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05

Tratamento	Agrotóxico (ng/L)			
	2,4-D	Fipronil	Fipronil sulfide	Fipronil sulfona
PE1	32,6	<LQ	<LQ	0,3
PE2	<LQ	0,6	<LQ	0,3
PE3	<LQ	0,6	<LQ	0,3
PE4	<LQ	0,7	<LQ	<LQ
$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	8,2±16,3	0,5±0,3	0,0±0,0	0,2±0,1
PI1	<LQ	0,7	<LQ	0,4
PI2	1516,2	0,6	<LQ	0,3
PI3	<LQ	0,9	<LQ	0,3
PI4	<LQ	0,8	<LQ	0,3
PI5	<LQ	0,8	<LQ	0,8
$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	303,2±678,1	0,8±0,1	0,0±0,0	0,4±0,2
C1	<LQ	3,4	<LQ	1,1
C2	282,8	27,8	0,9	6,1
C4	7407,4	19,4	0,9	2,3
C5	319,6	5,7	0,7	1,7
$\bar{X}_C \pm \sigma$	2002,5±3606,1	14,1±11,6	0,6±1,3	2,8±2,2
Valor estabelecido para águas doces na CONAMA 357 (BRASIL, 2005)	<4000 ng/L (Classes 1 e 2), <30000 ng/L (Classe 3)	-	-	-

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; LQ – limite de quantificação (2,4-D: 5 ng/L; Fipronil: 0,5 ng/L; Fipronil Sulfide: 0,5 ng/L; Fipronil Sulfona: 0,1 ng/L); \bar{X} - média; σ – desvio padrão.

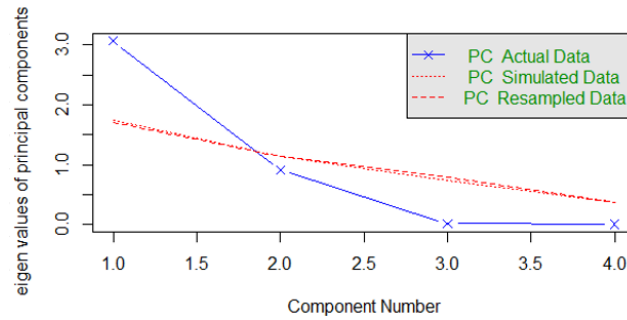
Fonte: Autoria própria

Outro ponto a ser observado diz respeito à solubilidade dos agrotóxicos, a qual indica a tendência destes compostos em serem carregados superficialmente no solo pela água da chuva ou de irrigação, atingindo as águas superficiais e os sedimentos (TOFFOLI, 2014). Em ecossistemas aquáticos, o inseticida fipronil pode ocorrer tanto na coluna d'água quanto no sedimento, enquanto o herbicida 2,4-D permanece principalmente na fase dissolvida (ISLAM et al., 2018).

O 2,4-D possui alta solubilidade em água (900 mg/L a 25°C), razão pela qual foi encontrado em maiores concentrações nas amostras analisadas (MAGNOLI et al., 2020). Quanto maior a hidrossolubilidade da molécula, maior a facilidade de transporte do agrotóxico até os corpos hídricos e, associado à ocorrência de chuvas, aumenta-se a probabilidade de contaminação ambiental por esses produtos (MARCHESAN et al., 2007; RAO; WAGENET, 1985). O limite máximo permitido de 2,4-D em águas doces é estabelecido pela Resolução CONAMA n°357/2005 como 4,0 µg/L para Classes 1 e 2, e 30,0 µg/L para Classe 3. Portanto, a unidade que ultrapassou o limite (para águas de Classe 1) foi o C4, o qual apresentou concentração de aproximadamente 7,4 µg/L de 2,4-D. Já o fipronil é considerado um composto estável à temperatura ambiente, possuindo baixa solubilidade em água e maior afinidade por matrizes orgânicas, como lipídeos, óleos e solventes orgânicos (GUNASEKARA et al., 2007), e, por isso, apresentou menores concentrações nas amostras.

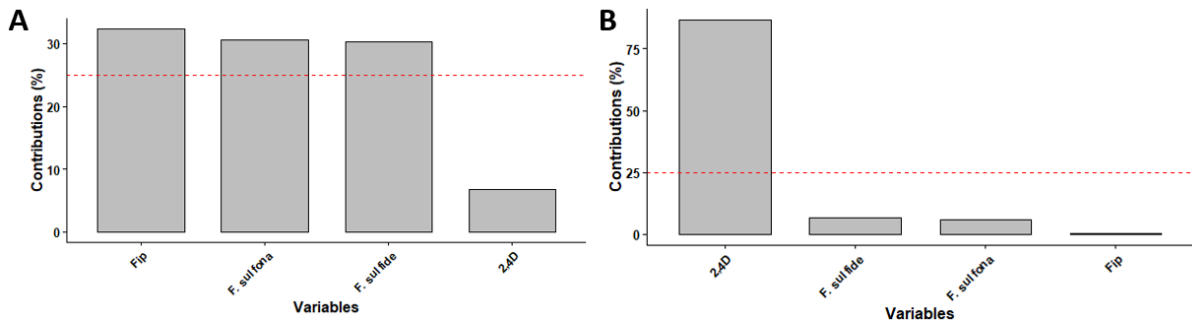
A Figura 21 apresenta a PCA para os agrotóxicos quantificados nas amostras de água dos mesocosmos, referente à coleta de janeiro/2020. Os eixos 1 e 2 explicam, respectivamente, 76,6 e 22,8% da variância dos dados, totalizando 99,4%. Pelo tamanho dos vetores, pode-se afirmar que os dois agrotóxicos (e os subprodutos do fipronil) apresentam a mesma porcentagem de contribuição para ambos os eixos. A Figura 19 e a Figura 20 auxiliam na interpretação da PCA, mostrando, respectivamente, o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (PC1) e as contribuições de cada variável da PC1 e PC2.

Figura 19 – Gráfico de análise de agrotóxicos que reteve o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (coleta de janeiro/2020)



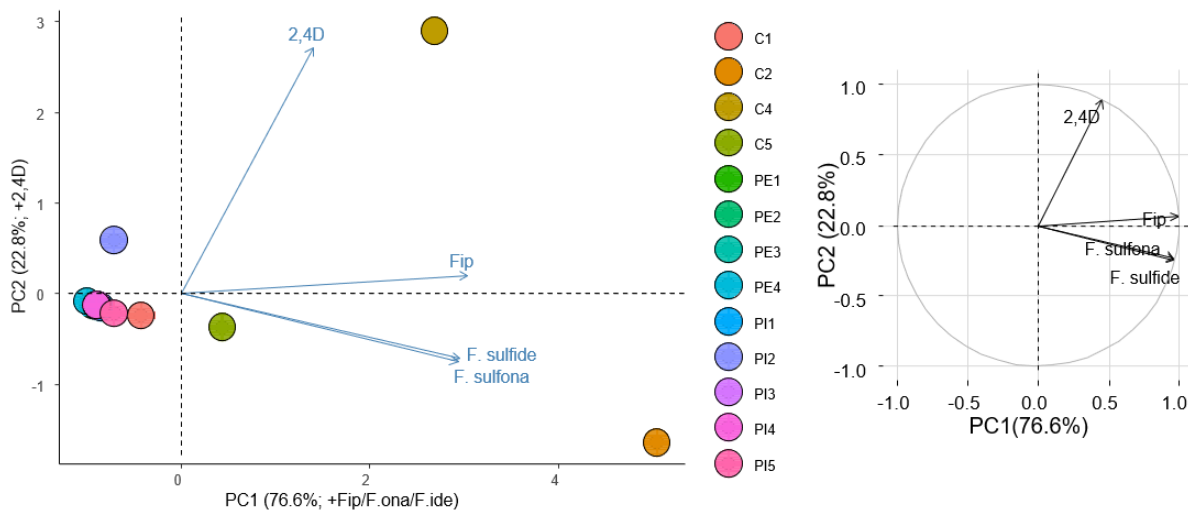
Fonte: Autoria própria

Figura 20 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1 e (B) PC2. As variáveis analisadas foram fipronil, fipronil sulfona, fipronil sulfide e 2,4-D (coleta de janeiro/2020)



Fonte: Autoria própria

Figura 21 – Diagrama da PCA para os agrotóxicos quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de janeiro/2020)



Fonte: Autoria própria

Três amostras dos *plots* da cana-de-açúcar, exceto o C1, apresentaram maior influência dos agrotóxicos em comparação aos demais tratamentos do solo, sendo o C4 o mais

relacionado ao 2,4-D e fipronil, enquanto C2 e C5 apresentam os maiores valores associados ao fipronil sulfide e fipronil sulfona. Isso é condizente ao fato de os *plots* desta área terem recebido aplicação de fipronil e 2,4-D em novembro e dezembro/2019, respectivamente. A declividade no terreno (destacada na Figura 3) provavelmente pode ter contribuído para o carreamento de agrotóxicos do tratamento pasto intensivo para os mesocosmos inseridos nos *plots* da cana-de-açúcar, principalmente no período chuvoso que prevaleceu durante a semana da coleta das amostras de água. Além disso, deve-se levar em conta o transporte do agrotóxico pelo vento durante sua aplicação (chamado de deriva), que também pode ter contribuído para o aporte do produto para os mesocosmos. Cunha (2008) realizou uma simulação da deriva de agrotóxicos em diferentes condições de pulverização e constatou que na maioria das condições avaliadas, o fenômeno da deriva estendeu-se prioritariamente por um comprimento de até 5 metros, chegando na distância horizontal máxima percorrida de 38,3 metros para gotas de 40 μm , ventos à 5 m/s e altura de lançamento de 0,8 m. Portanto, a deriva consiste em um problema e são imprescindíveis a escolha e uso adequado das pontas de pulverização para a melhoria das condições de precisão e segurança na aplicação de agrotóxicos (WOMAC; GOODWIN; HART, 1997).

As amostras dos mesocosmos do pasto extensivo, onde não houve a aplicação de 2,4-D e fipronil, apresentaram menor relação aos agrotóxicos, coincidente aos eventos ocorridos na área experimental. No entanto, conforme visto na Tabela 11, esses produtos também foram registrados nesse tratamento, mesmo que em baixas concentrações, provavelmente pela proximidade das áreas onde houve a aplicação e pela influência da área localizada próxima à unidade experimental, que é uma extensa plantação de cana-de-açúcar. Nesses casos, o vento pode ter sido o responsável pelo transporte dos agrotóxicos, aumentando a área de alcance além dos limites da aplicação do produto.

Brovini et al. (2021) realizaram uma análise considerando a combinação de duas abordagens – dados de monitoramento do governo brasileiro e dados da literatura –, a fim de estimar a concentração ambiental dos três agrotóxicos mais usados no país: 2,4-D, atrazina e glifosato. Para o 2,4-D, o estado de Sergipe apresentou a mediana mais alta (10 $\mu\text{g/L}$), enquanto a concentração mais alta foi encontrada no estado de Santa Catarina (74,5 $\mu\text{g/L}$), próximo à zona rural dedicada à agricultura. Já Marchesan et al. (2010) detectaram a presença do 2,4-D em 26,2% das amostras de água coletadas no rio Vacacaí em Santa Maria-RS (safra 2004/05), com concentrações variando de 0,9 a 2,7 $\mu\text{g/L}$. Para o fipronil, nas safras de

2005/06 e 2006/07, a detecção ocorreu em 90% e 80% das amostras, com concentrações de 0,05-16,3 µg/L e 2,2-26,2 µg/L, respectivamente. O fipronil foi o inseticida com maior frequência de detecção nas águas superficiais do Brasil no ano de 2016, com concentrações variando de 0,05 a 26,2 µg/L (ALBUQUERQUE et al., 2016; TINGLE et al., 2003). No período de 2018 e 2019, o fipronil também foi quantificado na maior parte das amostragens de monitoramento de águas doces superficiais no Brasil, registrando-se concentrações de 0,065 a 0,69 µg/L na estação chuvosa (CETESB, 2019b). No presente estudo, as maiores concentrações medidas (7,4 µg/L para 2,4-D – C4, e 0,03 µg/L para fipronil – C2) se mantiveram na ordem de grandeza das concentrações ambientais encontradas no país.

No que se refere às amostras coletadas do escoamento superficial, a Tabela 12 resume a quantificação de agrotóxicos nos três tratamentos (PE, PI e C).

Tabela 12 – Quantificação de agrotóxicos nas amostras de água de escoamento superficial nos três tipos de tratamento de solo

Tratamento	Agrotóxico (ng/L)			
	2,4-D	Fipronil	Fipronil Sulfide	Fipronil Sulfona
PE	52,2	1,3	<LQ	0,3
PI	43,9	0,8	<LQ	0,5
C	55,1	10,4	<LQ	<LQ

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; LQ – limite de quantificação (Fipronil Sulfide: 0,5 ng/L; Fipronil Sulfona: 0,1 ng/L).

Fonte: Autoria própria

A maior concentração para ambos os agrotóxicos foi detectada na área de cultivo de cana-de-açúcar. Para o 2,4-D, com maior solubilidade em água, os valores registrados nos três tratamentos foram similares, apesar do maior valor obtido na cana-de-açúcar. Já no fipronil, um composto mais estável, a concentração obtida em C foi de 10,4 ng/L, sendo cerca de 10 vezes maior que o valor obtido nas áreas de pastagens. Os tratamentos PE e PI apresentaram resultados semelhantes entre si, uma vez que são áreas abertas e a aplicação de agroquímicos em um tratamento pode influenciar os outros (devido ao vento, por exemplo).

Além disso, vale ressaltar que a área experimental é circundada por plantações de cana-de-açúcar, o que também pode influenciar os resultados, mesmo que os tratamentos PE não tenham recebido nenhuma aplicação de agrotóxicos e fertilizantes. Estima-se que menos de 0,1% dos agrotóxicos aplicados nas lavouras atinjam seus alvos específicos, podendo contaminar a água, solo, sedimento, alimentos e o ar, tornando-se uma preocupação grave tanto para a saúde humana quanto para o ecossistema (ISLAM et al., 2018; SOLONESKI;

NIKOLOFF; LARRAMENDY, 2016). No meio ambiente, essa movimentação dos produtos ocorre por diferentes mecanismos, como água da chuva, volatilização, deriva, remoção de culturas, lixiviação, absorção pelas plantas, adsorção, escoamento superficial, percolação, entre outros. (QURRATU; REEHAN, 2016; SOLONESKI; NIKOLOFF; LARRAMENDY, 2016).

A Tabela 13 resume a quantificação de agrotóxicos em amostras de sedimento dos mesocosmos. O fipronil foi quantificado em maiores concentrações nas amostras do tratamento da cana-de-açúcar, local onde ocorreu a aplicação do inseticida em novembro/2019. Era esperado que o fipronil ocorresse em um maior número de amostras comparado ao 2,4-D devido ao fato do primeiro ser menos solúvel em água, ou seja, em ambientes aquáticos o resíduo do agrotóxico tende a se ligar ao material particulado em suspensão ou se depositar no sedimento, podendo chegar até 95% de transferência de resíduos de fipronil da água para o sedimento dentro de uma semana de aplicação do produto (PEDRO, 2008; TINGLE, 2003). A sorção de compostos não-iônicos, como o fipronil, é influenciada pela polaridade e partição hidrofóbica na matéria orgânica (PIASAROLO; RIGITANO, GUERREIRO, 2008), portanto o agrotóxico pode ter persistido na água provavelmente devido à baixa capacidade de retenção do sedimento ou devido à aderência às partículas orgânicas suspensas na coluna d'água. De forma semelhante, no estudo de Peret et al. (2010) os autores mostraram que 72% do fipronil permaneceu na coluna d'água, associado ao fato de o mesmo permanecer aderido à matéria orgânica.

Tabela 13 – Quantificação de agrotóxicos no sedimento dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020)

Tratamento	Agrotóxico (pg/g)			
	2,4-D	Fipronil	Fipronil Sulfide	Fipronil Sulfona
PE1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
PE2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
PE3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
PE4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
PI1	<LQ	39,6	<LQ	<LQ
PI2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
PI3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
PI4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
PI5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	0,0±0,0	7,9±17,7	0,0±0,0	0,0±0,0
C1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
C2	<LQ	22,9	<LQ	<LQ
C4	<LQ	31,9	<LQ	<LQ
C5	<LQ	48,4	<LQ	<LQ
$\bar{X}_C \pm \sigma$	0,0±0,0	25,8±20,2	0,0±0,0	0,0±0,0

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; LQ – limite de quantificação (2,4-D: 0,75 ng/g; Fipronil: 0,015 ng/g; Fipronil Sulfide: 0,075 ng/g; Fipronil Sulfona: 0,015 ng/g); \bar{X} - média; σ – desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

5.2.3 Nutrientes

A Tabela 14 sintetiza a quantificação de nutrientes nas amostras de água dos mesocosmos dos três tratamentos de solo (PE, PI e C). Observa-se que os tratamentos PI e C apresentaram maiores concentrações dos compostos fosfatados, devido à aplicação de fertilizantes anteriormente à data da coleta das amostras. Os resultados de condutividade, por exemplo, demonstram maiores valores em PI (18,70 $\mu\text{S}/\text{cm}$) e C (13,20 $\mu\text{S}/\text{cm}$), em relação ao PE (8,00 $\mu\text{S}/\text{cm}$) na água dos mesocosmos, o que atesta o carreamento contínuo de material alóctone para dentro do sistema.

Tabela 14 – Quantificação de nutrientes das amostras de água dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05

Variáveis ($\mu\text{g/L}$)	Tratamento																Valor estabelecido para águas doces na CONAMA 357 (BRASIL, 2005)
	PE1	PE2	PE3	PE4	$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	PI1	PI2	PI3	PI4	PI5	$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	C1	C2	C4	C5	$\bar{X}_C \pm \sigma$	
NT (Nitrogênio total)	930	980	1260	1260	1107,5 \pm 177,3	1310	930	1350	1350	1540	1296 \pm 223,3	1630	1590	1540	1260	1505 \pm 167,4	Lêntico: \leq 1270 (Classes 1 e 2)
NO₂⁻ (Nitrito)	1,2	1,7	2,5	2,1	1,9 \pm 0,6	2,8	2,5	3,4	2,9	5,9	3,5 \pm 1,4	3,2	2,6	3,4	3,6	3,2 \pm 0,4	\leq 1000
NO₃⁻ (Nitrato)	49,9	70,0	43,9	43,0	51,7 \pm 12,6	80,0	63,4	92,0	37,0	20,8	58,6 \pm 29,5	44,9	40,6	31,0	16,7	33,3 \pm 12,5	\leq 10000
NH₄⁺ (Íon amônio)	10,0	18,3	10,9	19,2	14,6 \pm 4,8	10,6	20,0	47,0	18,7	19,1	23,1 \pm 13,9	12,0	21,4	13,0	34,8	20,3 \pm 10,5	-
PT (Fósforo total)	61,7	157,2	173,4	106,4	124,7 \pm 50,8	182,4	105,6	215,3	283,1	184,8	194,2 \pm 64,1	368,8	203,6	76,0	107,4	188,9 \pm 131,6	Lêntico: \leq 20 (Classe 1), \leq 30 (Classe 2), \leq 50 (Classe 3)
Pi (Fosfato inorgânico)	5,2	10,7	15,2	11,5	10,7 \pm 4,1	14,7	14,3	80,3	106,5	29,6	49,1 \pm 42,0	36,4	33,9	17,6	23,1	27,8 \pm 8,9	-
PTD (Fósforo total dissolvido)	18,6	19,6	29,2	21,7	22,3 \pm 4,8	34,9	29,7	100,5	128,7	58,6	70,5 \pm 42,9	63,9	50,9	37,7	47,7	50,1 \pm 10,8	-
SiO₂ (Silicato)	660	780	930	770	785 \pm 110,9	840	790	1010	920	1610	1034 \pm 332,6	870	700	780	800	787,5 \pm 69,9	-

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; \bar{X} – média; σ – desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

O nitrogênio é um dos elementos essenciais para o funcionamento de ecossistemas aquáticos, pois atua na formação de proteínas (componentes básicos da biomassa), e pode ser encontrado nas águas nas formas de nitrogênio orgânico e amoniacal (formas reduzidas) ou nitrito e nitrato (formas oxidadas) (CETESB, 2020). Essas formas variam nas zonas de autodepuração natural em rios, com a maior presença de nitrogênio orgânico na zona de degradação, amoniacal na zona de decomposição ativa, nitrito na zona de recuperação e nitrato na zona de águas limpas (CETESB, 2020). Para águas doces de Classes 1 e 2, quando o nitrogênio for fator limitante para eutrofização, o valor limite de nitrogênio total (após oxidação) é de 1,27 mg/L para ambientes lênticos (BRASIL, 2005). Dentre as amostras coletadas, sete delas (PI1, PI3, PI4, PI5, C1, C2 e C4) não se enquadram no limite estabelecido para o ambiente lêntico, que são locais de águas quase paradas ou lentamente renovadas, com sistema fechado de ciclagem de nutrientes (OLIVEIRA; GOULART, 2000). Os mesocosmos podem ser comparados com sistemas lênticos, e um dos desequilíbrios que ocorre nesse sistema é a eutrofização. Esse processo tem sido observado em reservatórios e lagos devido ao aumento do uso de fertilizantes, aumento populacional e o elevado grau de urbanização das cidades, contribuindo com o aporte de nutrientes e matéria orgânica (BEM, 2009).

Para as três classes de água doce, o valor máximo estabelecido para nitrato e nitrito é de 10 mg/L e 1 mg/L, respectivamente (BRASIL, 2005). Portanto, todas as amostras se enquadram nesse requisito da legislação. A amônia é gerada durante o processo de decomposição da matéria orgânica dissolvida e particulada, e no meio aquático, especialmente em valores de pH ácido e neutro, a amônia formada é instável, sendo convertida por hidratação a íon amônio, que é oxidado, por intermédio de bactérias, para nitrito (ESTEVES, 1998). O nitrito é um elemento de transformação rápida, e pode ser transformado em nitrato durante o seu transporte no solo, dependendo das condições químicas do meio (KAUFMANN; PINHEIRO; CASTRO, 2014). Além disso, o nitrato é um íon livremente móvel na solução do solo, potencialmente vulnerável à lixiviação à medida que a água se move através do solo (HOODA et al., 2000), podendo atingir os corpos d'água. Assim, justifica-se as maiores concentrações de nitrato encontradas em todas as amostras dos três tratamentos de solo, se comparado com o nitrito e íon amônio.

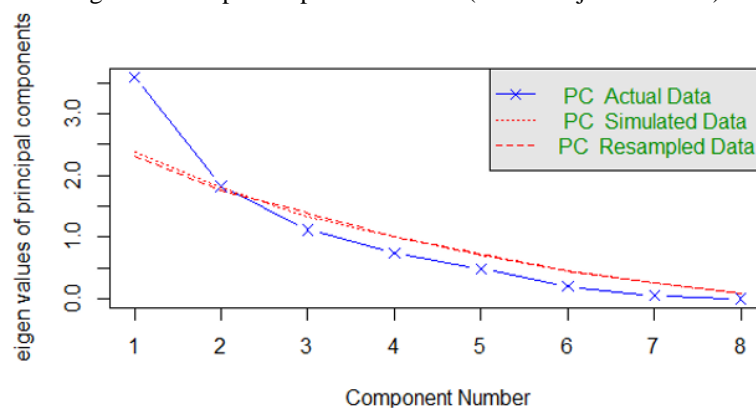
O fósforo também é um dos principais nutrientes para processos biológicos, sendo assimilado pelo fitoplâncton, bactérias, e plantas bentônicas, e remineralizado por atividades

heterotróficas dos animais e microrganismos, porém, quando em excesso, pode desencadear processos de eutrofização das águas (CETESB, 2020; SANTOS et al., 2007). O valor máximo permitido de fósforo total em ambiente lântico é estabelecido pela Resolução CONAMA n°357/2005 como 0,020 mg/L para corpos d'água de Classe 1, e 0,030 mg/L para Classe 2 e 0,05 para Classe 3. Assim, todas as amostras ultrapassaram a concentração limite de fósforo total, para todas as classes de enquadramento. As altas concentrações de nitrogênio e fósforo nas amostras pode estar relacionada ao uso de fertilizantes, decomposição de macrófitas e eutrofização dos mesocosmos, assuntos que serão abordados no decorrer do trabalho.

Quanto ao silicato (SiO_2), este é o mineral primário mais abundante nos solos, constituindo a base da estrutura da maioria dos argilominerais (BARBOSA FILHO et al., 2001). Porém, os solos perdem rapidamente quantidades consideráveis de silicato ao longo do processo de intemperização, comum nas regiões tropicais (BARBOSA FILHO et al., 2001; KORNDÖRFER, 2006), podendo explicar as altas concentrações desse nutriente que foram quantificadas nas amostras dos mesocosmos, sendo similares entre os tratamentos do solo e com as maiores concentrações encontradas nas amostras do PI5 e PI3 (1610 e 1010 $\mu\text{g/L}$, respectivamente).

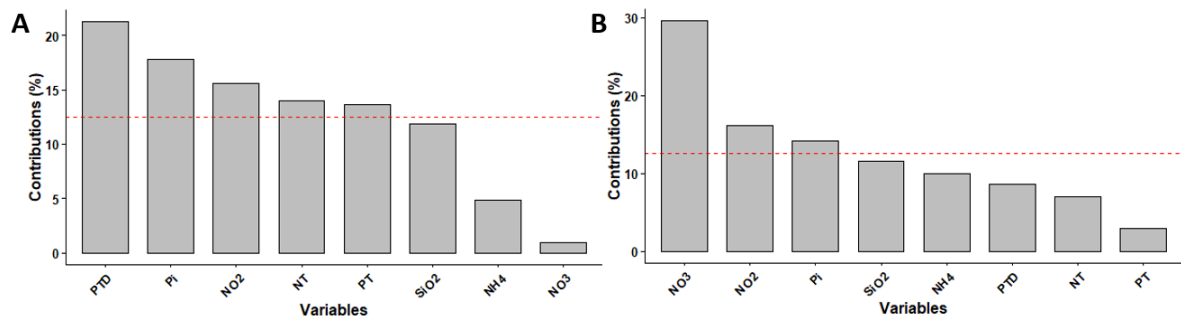
A Figura 24 apresenta a PCA para os nutrientes quantificados nas amostras de água dos mesocosmos, referente à coleta de janeiro/2020. Os eixos 1 e 2 explicam, respectivamente, 44,8 e 22,8% da variância dos dados, totalizando 67,6%. A Figura 22 e a Figura 23 auxiliam na interpretação da PCA, mostrando, respectivamente, os dois primeiros componentes principais mais significativos para explicar os dados (PC1 e PC2) e as contribuições de cada variável da PC1 e PC2.

Figura 22 – Gráfico de análise de nutrientes que reteve os dois primeiros componentes principais como mais significativos para explicar os dados (coleta de janeiro/2020)



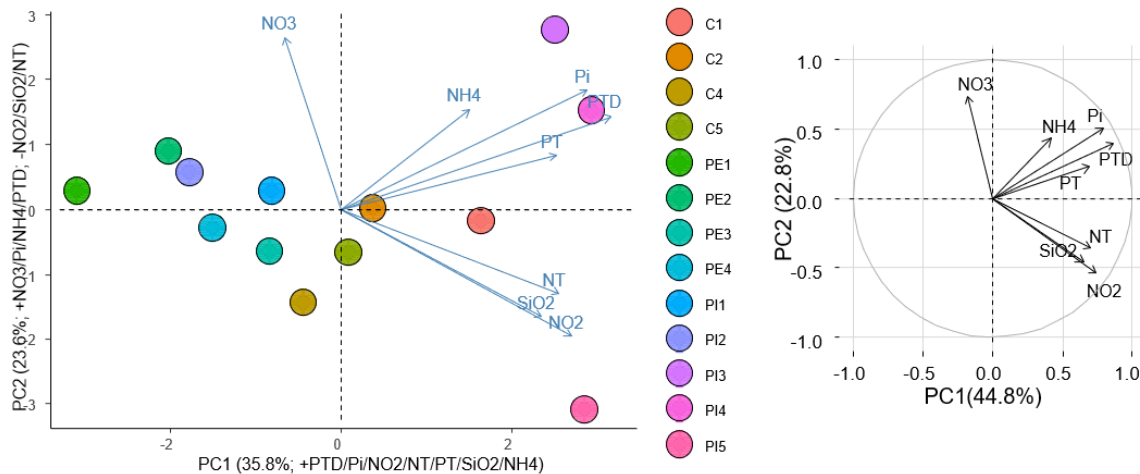
Fonte: Autoria própria

Figura 23 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1 e (B) PC2. As variáveis analisadas foram fósforo total dissolvido (PTD), fósforo inorgânico (Pi), silicato (SiO_2), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), nitrogênio total (NT), fósforo total (PT) e íon amônio (NH_4^+) (coleta de janeiro/2020)



Fonte: Autoria própria

Figura 24 – Diagrama da PCA para os nutrientes quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de janeiro/2020)



Fonte: Autoria própria

De forma geral, observa-se que o tratamento da cana-de-açúcar e pasto intensivo apresentaram maior relação com os nutrientes, conforme constatado pelas concentrações nas tabelas anteriores. Essa relação provavelmente provém da aplicação dos fertilizantes NPK no tratamento C e PI, e fertirrigação com vinhaça nos mesocosmos C4 e C5 da cana-de-açúcar. Os mesocosmos C1, PI3 e PI4 são influenciados pelas variáveis explicativas de ambos os eixos, principalmente fósforo total dissolvido, fosfato inorgânico, fósforo total e íon amônio.

A presença de compostos fosfatados em ecossistemas aquáticos pode ser de origem natural (dissolução de componentes do solo e decomposição de matéria orgânica, por exemplo) ou antropogênica, como fertilizantes agrícolas e dejetos de animais (DELELLO, 2008). Portanto, a presença destes compostos em maior quantidade nos tratamentos PI e C provavelmente está relacionado aos fertilizantes aplicados no solo. Além do fertilizante NPK, as áreas de cana-de-açúcar (mesocosmos C4 e C5) também foram fertirrigadas com vinhaça,

que é um composto rico em nitrogênio e provavelmente contribuiu para as altas concentrações de nutrientes nitrogenados e fósforo quantificados nas amostras de água dos mesocosmos deste tratamento, uma vez que as concentrações de NT e PT na vinhaça bruta utilizada eram de 1,4 e 0,2 g/L, respectivamente. Ogura et al. (2022b) avaliaram a germinação e crescimento de plantas irrigadas com água de mesocosmos contaminados com 2,4-D, fipronil e vinhaça, e constataram que a vinhaça individualmente foi responsável pela alteração mais significativa na qualidade da água, apresentando menor pH e altos valores de condutividade (303,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$), turbidez (314 UNT), nitrogênio total (15,5 mg/L) e fósforo total (1133 $\mu\text{g}/\text{L}$) em relação ao controle, 2h após a contaminação.

Wijewardene et al. (2021) associaram as maiores concentrações de nutrientes ($\text{PO}_4\text{-P}$ e $\text{NH}_4\text{-N}$) com baixos níveis de OD e nível d'água em corpos d'água lênticos, em uma planície agrícola alemã. Conforme visto, as amostras dos mesocosmos inseridos nos *plots* C1, PI3, PI4 e PI5 apresentaram alta relação com nutrientes e baixas concentrações de oxigênio dissolvido (0,3; 0,17; 0,4 e 0,08 mg/L, respectivamente). Nesses mesmos mesocosmos também foram registradas as maiores concentrações de fósforo total (173, 283, 369 e 188 $\mu\text{g}/\text{L}$, respectivamente). A perda de fósforo associada aos fertilizantes normalmente acontece logo após a aplicação do produto, atingindo seu máximo em épocas de precipitação elevada (MCDOWELL; TRUDGILL, 2000; UDEIGWE et al., 2010), portanto pode-se justificar as maiores concentrações de nutrientes obtidas na coleta do presente estudo (janeiro/2020), uma vez que a mesma foi realizada após a aplicação dos agroquímicos e com seis dias consecutivos de chuva na semana da coleta.

Já as amostras do pasto extensivo apresentaram menor influência dos nutrientes. Esse resultado é compatível aos eventos ocorridos na área experimental, uma vez que neste tratamento não foram aplicados produtos agroquímicos. Porém, apesar das menores concentrações quantificadas nas amostras do PE, ainda é observada a ocorrência de nutrientes fosfatados e nitrogenados (Tabela 14), provavelmente relacionada ao aporte de dejetos decorrentes da pastagem de gado que ocorreu na área em dezembro/2019 e janeiro/2020.

Outro fator que também pode ter influenciado na concentração de nutrientes em todos os mesocosmos foi a decomposição das macrófitas aquáticas. Azevedo et al. (2008) monitoraram a decomposição de macrófitas aquáticas (*Eichhornia azurea*) colocadas em recipientes de água e, inicialmente, os autores observaram uma maior liberação de nutrientes (formas nitrogenadas e fósforo) e diminuição do OD e pH. Nitrito, nitrato e nitrogênio

amoniacal apresentaram maiores concentrações no início da decomposição, sofrendo redução ao longo do processo, enquanto a concentração de nitrogênio orgânico aumentou em função do tempo e o fósforo se manteve estável. Assim, provavelmente as macrófitas contribuíram para a liberação de nutrientes nos mesocosmos, a depender da quantidade de plantas e da etapa do processo de decomposição.

A Tabela 15 sintetiza a quantificação de nutrientes do escoamento superficial nos três tratamentos de solo. O uso de adubos e fertilizantes em lavouras tende a aumentar as concentrações de fósforo e potássio na superfície do solo, causando a perda desses nutrientes por escoamento superficial, o qual ocorre durante eventos de chuva-vazão (COSTA, 2004). Verifica-se que os tratamentos PI e C foram os que apresentaram maiores concentrações dos compostos fosfatados, refletindo o uso dos fertilizantes que foram aplicados anteriormente à data da coleta das amostras. As concentrações são elevadas e estas, atingindo os mesocosmos, com certeza contribuiriam para o aporte de nitrogênio e fósforo, provavelmente implicando na eutrofização dos corpos hídricos experimentais.

Tabela 15 – Quantificação de nutrientes das amostras de água de escoamento superficial nos três tipos de tratamento de solo

Variável ($\mu\text{g/L}$)	Tratamento		
	PE	PI	C
NT (Nitrogênio total)	5180	5130	5090
NO_2^- (Nitrito)	15,4	14,2	11,6
NO_3^- (Nitrato)	10,8	11,2	10,5
NH_4^+ (Íon amônio)	1682,1	1250,7	1716,3
PT (Fósforo total)	833,8	1971,4	1369,1
Pi (Fosfato inorgânico)	97,5	227,3	1087,8
PTD (Fósforo total dissolvido)	100,4	230,5	1109,7
SiO_2 (Silicato)	710	1540	1150

Fonte: Autoria própria

Além disso, os principais ânions presentes na vinhaça são cloreto, sulfato, fosfato, nitrato e pequenas quantidades de bicarbonatos, os quais podem ter dois tipos de comportamento no solo, dependendo das cargas na superfície das partículas. Caso o predomínio seja de cargas negativas, os ânions não serão adsorvidos pelo solo e, conseqüentemente, podem ser lixiviados (SOTO; BASSO; KIANG, 2017). Portanto, as altas concentrações de nutrientes obtidas nas amostras do escoamento superficial são provavelmente derivadas da lixiviação após o uso de fertilizantes (tratamentos PI e C) e

fertirrigação com vinhaça (solo e mesocosmos dos *plots* C4 e C5). Nos tratamentos PI e PE, onde houve pastagem do gado, o aporte de nutrientes também pode ter influência do pisoteio, que agrava a compactação do solo e erosão superficial, favorecendo a lixiviação de nitrogênio e fósforo (OLIVEIRA et al., 2021). Além disso, até 95% do nitrogênio ingerido pelos animais são retornados ao solo via urina e fezes (WHITEHEAD, 1990), contribuindo para a presença desse nutriente no escoamento superficial.

O transporte de nutrientes varia em função do tempo e espaço, distribuição de chuvas, escoamento superficial, cobertura do solo, aplicação de fertilizantes e gradiente de declividade (LI et al., 2020). Comparando-se a quantificação de nutrientes das amostras de água dos mesocosmos e do escoamento superficial, nota-se que as concentrações obtidas para o segundo são significativamente maiores, principalmente para o íon amônio e os compostos fosfatados, ficando evidente a contribuição externa e difusa de nutrientes e agrotóxicos, a qual contribui para alterações na qualidade da água dos corpos hídricos experimentais deste estudo. Além disso, também se observou que o fosfato inorgânico foi quantificado em maiores concentrações no escoamento superficial do que nas amostras de água, com o maior valor obtido no tratamento C (1087,8 µg/L). Santos et al. (2012) constataram que bactérias diazotróficas do solo, que normalmente colonizam a região rizosférica de plantas (inclusive a cana-de-açúcar) têm a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico. Portanto, provavelmente a maior concentração desse nutriente no escoamento superficial da cana-de-açúcar pode estar relacionada também à atividade microbiana do solo nesse tratamento.

No que diz respeito ao íon amônio, é esperado que este, por ser um cátion, seja adsorvido pelas cargas negativas do solo (SILVA et al., 2010). Porém, o regime de chuvas altera a umidade do solo e, certamente, influencia a concentração dos íons na fase líquida do solo, tornando-os mais passíveis de serem transportados por fluxo de massa junto com a água (SILVA et al., 2010). Observa-se que nas amostras dos três tratamentos o íon amônio foi quantificado em altas concentrações, provavelmente devido à precipitação abundante que ocorreu no mês da coleta, favorecendo o transporte desse íon via escoamento superficial.

5.2.4 Metais

A Tabela 16 sintetiza a quantificação de metais nas amostras de água dos mesocosmos. Observa-se que os metais encontrados em maiores concentrações foram alumínio, bário, zinco e potássio. A maior quantidade de alumínio foi obtida no tratamento da

cana-de-açúcar, principalmente no C5 (0,913 mg/L). O *plot* PI4 apresentou a maior concentração de bário (0,301 mg/L) e de zinco (0,277 mg/L). Quanto ao potássio, a maior concentração foi quantificada no PI5 (11,8 mg/L). Vale ressaltar que os metais cobalto e cromo não constam na análise da coleta de janeiro/2020, pois as concentrações permaneceram abaixo do limite de quantificação nas amostras.

Para o bário, nenhuma amostra excedeu os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA n°357/2005, definidos como 0,7 mg/L (Classes 1 e 2) e 1 mg/L (Classe 3). Para o alumínio, o limite é de 0,1 mg/L (Classes 1 e 2) e 0,2 mg/L (Classe 3), portanto apenas uma amostra (PE4) não excedeu o limite de 0,1 mg/L e 4 das 13 amostras apresentaram concentrações superiores a 0,2 mg/L (PI4, PI5, C1 e C5). Os valores máximos para o zinco são de 0,18 mg/L (Classes 1 e 2) e 5 mg/L (Classe 3), portanto todas as amostras se encontram dentro do limite apenas para corpos d'água de Classe 3. Já para o cobre, a Resolução estabelece os limites de 0,009 mg/L (Classes 1 e 2) e 0,013 mg/L (Classe 3), portanto apenas os *plots* C2, C4 e C5 se encontram dentro do limite para corpos d'água de Classes 1 e 2, somando-se aos *plots* PE1 e PI1 para Classe 3. As concentrações dos outros metais se encontram dentro do limite estabelecido pela Resolução.

O pH exerce grande influência sobre a disponibilidade dos metais, sendo a maioria insolúvel em água com pH neutro ou básico, portanto, a acidez favorece a solubilização de metais nas águas superficiais (BAGGIO FILHO, 2008). Os metais que ultrapassaram o valor máximo permitido por legislação podem estar relacionados à acidez das amostras, uma vez que a faixa de pH medida na água dos mesocosmos variou entre 5,6 e 6,3, o que é considerado ácido.

Baggio Filho (2008) avaliou a concentração e a distribuição de metais pesados ao longo do perfil longitudinal do Rio Formoso, em Minas Gerais, cuja bacia hidrográfica está inserida em uma área com latifúndios agropecuários. As maiores concentrações de metais encontrados pelo autor foram: 2,9 mg/L para alumínio, 0,11 mg/L para manganês, 0,005 mg/L para cobre, 0,001 mg/L para cádmio, 0,052 mg/L para cromo, 0,02 mg/L para níquel e 0,0003 mg/L para zinco. Estas se encontram na mesma ordem de grandeza, porém a quantificação de cobre e zinco nas amostras do presente estudo apresentou maiores concentrações. O aumento da concentração de cobre pode estar relacionado ao uso intensivo do solo (alta erodibilidade) e componentes ativos de sais de cobre que compõe os agrotóxicos (BAGGIO FILHO, 2008).

Corbi et al. (2006) realizaram um diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar na região central do estado de São Paulo e constataram que as maiores concentrações de cobre e zinco foram encontradas nos córregos situados nas áreas de cana-de-açúcar. Os autores justificaram que a contaminação por Cu pode ter origem nos esgotos domésticos ou lixiviação de produtos agrícolas por meio da chuva, enquanto os altos valores de Zn podem estar relacionados à queima da cana. Dessa forma, pode-se relacionar as maiores concentrações desses dois metais ao uso do solo predominantemente agrícola.

Dentre os metais, o potássio apresentou as maiores concentrações. É um metal que apresenta alto potencial de lixiviação, a depender de suas concentrações no solo, biodisponibilidade, regime de chuvas e textura do solo (SERAFIM et al., 2021). Além disso, a vinhaça possui o potássio como metal mais abundante, variando entre 814 e 3852 mg/L, considerando a média de 64 amostras de 28 usinas do Estado de São Paulo (GIRARDI, 2009). A vinhaça bruta aplicada em Brotas possui concentração de potássio ainda maior, de 8 g/L (Tabela 2). Portanto, era esperado que as amostras do tratamento C e do PI apresentassem maiores concentrações deste metal, visto que receberam aplicação de vinhaça (*plots* C4 e C5) e de NPK (todos os *plots* de PI e C). Conforme visto, as concentrações mais elevadas de potássio foram detectadas nas amostras do PI5 (11,8 mg/L), PI3 (2,8 mg/L) e PI4 (1,4 mg/L). Isso pode ser explicado pelo fato de o potássio ser o segundo elemento mais absorvido pelas plantas (BERNARDI, 2013), portanto no tratamento C provavelmente a cana-de-açúcar absorveu grande parte desse metal, reduzindo sua disponibilidade no solo. Além disso, os sistemas intensivos de manejo de pastagem apresentam maior possibilidade de lixiviação em altas doses de metais, principalmente devido ao pH ácido que favorece a solubilização desses metais na água presente no solo (BERNARDI, 2013), podendo explicar as maiores concentrações encontradas no tratamento PI. Quanto à maior concentração quantificada no PI5, pode estar relacionado com o fato desse mesocosmo ser o último da fileira do tratamento PI, localizado em uma região com menor declividade e com possibilidade de receber maior quantidade de material carreado da porção superior.

Tabela 16 – Quantificação de metais nas amostras de água dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05

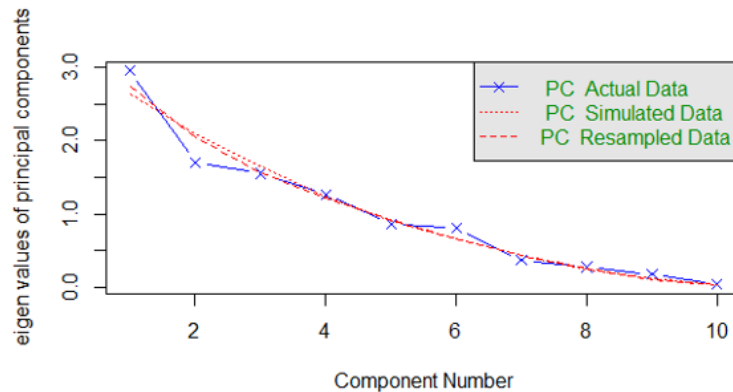
Metais (mg/L)	Tratamento																Valor estabelecido para águas doces na CONAMA 357 (BRASIL, 2005)
	PE1	PE2	PE3	PE4	$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	PI1	PI2	PI3	PI4	PI5	$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	C1	C2	C4	C5	$\bar{X}_C \pm \sigma$	
Alumínio (Al)	0,101	0,149	0,164	0,094	0,127±0,035	0,183	0,149	0,114	0,376	0,301	0,225±0,110	0,46	0,121	0,183	0,913	0,419±0,361	≤0,1 (Classes 1 e 2), ≤0,2 (Classe 3)
Bário (Ba)	0,185	0,264	0,287	0,260	0,249±0,044	0,235	0,257	0,271	0,301	0,235	0,260±0,028	0,226	0,242	0,213	0,225	0,227±0,012	≤0,7 (Classes 1 e 2), ≤1,0 (Classe 3)
Cádmio (Cd)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000	0,004	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001±0,002	0,002	0,000	0,000	0,001	0,001±0,001	≤0,001 (Classes 1 e 2), ≤0,01 (Classe 3)
Cobre (Cu)	0,012	0,023	0,02	0,017	0,018±0,005	0,011	0,087	0,015	0,038	0,026	0,035±0,031	0,019	0,003	0,004	0,007	0,008±0,007	≤0,009 (Classes 1 e 2), ≤0,013 (Classe 3)
Manganês (Mn)	0,007	0,031	0,036	0,030	0,026±0,013	0,029	0,032	0,039	0,037	0,071	0,042±0,017	0,07	0,018	0,000	0,011	0,025±0,031	≤0,1 (Classes 1 e 2), ≤0,5 (Classe 3)
Molibdênio (Mo)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000	0,000	0,000	0,061	0,006	0,017±0,030	-
Níquel (Ni)	0,000	0,005	0,002	0,018	0,006±0,008	0,000	0,001	0,002	0,000	0,000	0,001±0,001	0,000	0,000	0,002	0,022	0,006±0,011	≤0,025
Estrôncio (Sr)	0,005	0,006	0,01	0,006	0,007±0,002	0,015	0,008	0,015	0,025	0,011	0,015±0,006	0,015	0,007	0,005	0,008	0,009±0,004	-
Zinco (Zn)	0,173	0,276	0,257	0,216	0,0231±0,046	0,206	0,257	0,208	0,277	0,268	0,243±0,034	0,185	0,19	0,208	0,256	0,210±0,032	≤0,18 (Classes 1 e 2), ≤5,0 (Classe 3)
Potássio (K)	0,669	0,681	0,951	0,942	0,811±0,157	0,624	0,744	2,800	1,446	11,784	3,480±4,722	0,788	0,655	0,448	0,665	0,639±0,141	-

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; \bar{X} – média; σ – desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

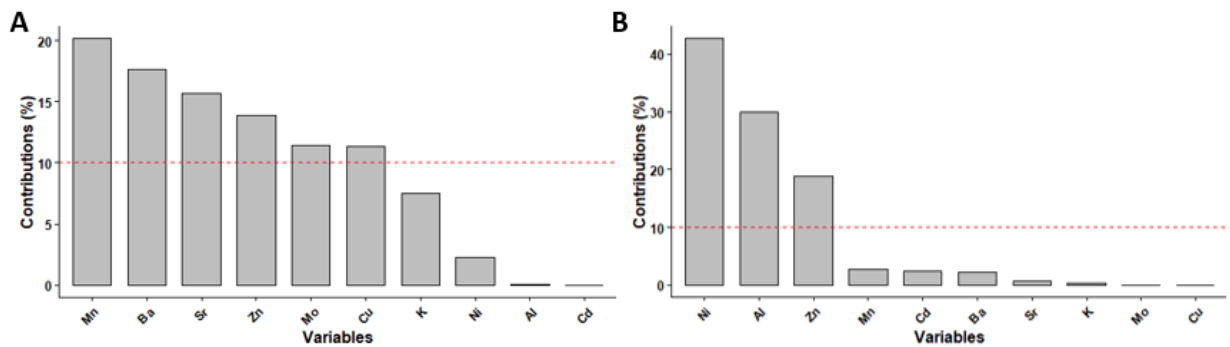
A Figura 27 apresenta a PCA para os metais quantificados nas amostras de água dos mesocosmos, referente à coleta de janeiro/2020. Os eixos 1 e 2 explicam, respectivamente, 29,5 e 17,1% da variância dos dados, totalizando 46,6%. A Figura 25 e a Figura 26 auxiliam na interpretação da PCA, mostrando, respectivamente, o componente principal mais significativo para explicar os dados (PC1) e as contribuições de cada variável da PC1 e PC2.

Figura 25 – Gráfico de análise de metais que reteve o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (coleta de janeiro/2020)



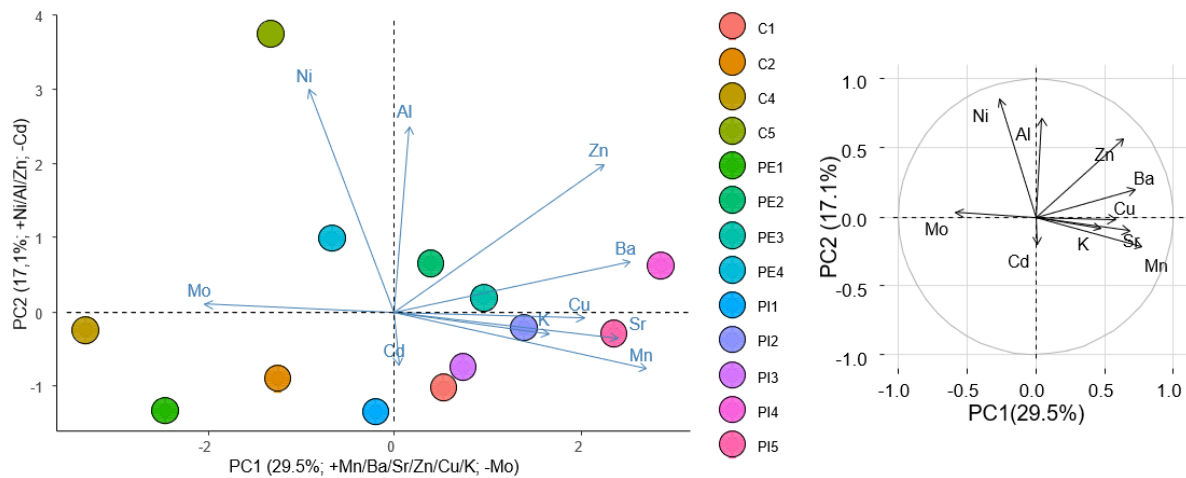
Fonte: Autoria própria

Figura 26 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1 e (B) PC2. As variáveis analisadas foram bário, estrôncio, manganês, potássio, molibdênio, cobre, zinco, níquel, cádmio e alumínio (coleta de janeiro/2020)



Fonte: Autoria própria

Figura 27 – Diagrama da PCA para os metais quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de janeiro/2020)



Fonte: Autoria própria

De maneira geral, a localização dispersa dos vetores significa que existe uma baixa correlação entre os metais. Quanto ao tratamento da cana-de-açúcar, o mesocosmo do *plot* C5 apresentou os maiores valores associados ao eixo 2 (principalmente alumínio e níquel), enquanto C2 e C4 apresentaram a menor relação com as variáveis analisadas. Do pasto intensivo, as amostras de água dos mesocosmos que apresentaram maior relação com os metais foram a dos *plots* PI5 (Mn, Sr, Cu e K), PI4 (Ba) e PI2 (K e Cu). A relação de PI2, PI3, PI4 e PI5 com o potássio pode ser explicada pela aplicação de NPK no pasto intensivo em outubro/2019.

Uma das fontes potenciais de metais no solo é a contaminação antropogênica que, no caso deste estudo, se refere ao uso de insumos agrícolas. Por meio de lixiviação, esses metais são mobilizados e podem atingir os corpos hídricos, comprometendo a qualidade da água. Metais como cádmio, cobre, manganês, níquel, chumbo e zinco estão presentes naturalmente nas rochas fosfáticas, utilizadas na produção de fertilizantes fosfatados (BOURLEGAT, 2010). A vinhaça, resíduo agroindustrial utilizado como fertilizante, também possui teores altos de potássio, magnésio, manganês e ferro em sua composição (ELIAS NETO; NAKAHODO, 1995). Conforme visto na Tabela 2, as concentrações desses metais na vinhaça bruta utilizada eram de 8,5 mg/L (K), 0,9 mg/L (Mg), 13,3 mg/L (Mn) e 29,8 mg/L (Fe). Portanto, a presença de metais nas amostras dos mesocosmos provavelmente é derivada do uso de fertilizante (NPK) nos tratamentos PI e C, e da vinhaça aplicada no solo e no interior dos mesocosmos C4 e C5, além da composição química do próprio solo da região de cerrado, que em sua maioria possui pH ácido, favorecendo a ocorrência do íon Al^{+3} (solúvel) de forma

significativa tanto na solução do solo como em sítios de troca catiônica, tornando o solo rico em alumínio (HARIDASAN, 2008). Além disso, a vinhaça, sendo um produto de caráter ácido (pH = 4, Tabela 2), também pode ter contribuído para a solubilização do alumínio, visto que a maior concentração de alumínio foi quantificada no mesocosmo C4 (0,913 mg/L), o qual foi fertirrigado com vinhaça.

A Tabela 17 sintetiza a quantificação de metais nas amostras de água do escoamento superficial dos três tratamentos de solo. O maior valor obtido foi de 44 mg/L de alumínio no PI. Observa-se que as concentrações deste metal são significativamente maiores do que as quantificadas nas amostras de água dos mesocosmos, provavelmente devido ao carreamento do alumínio presente no solo. As concentrações de manganês, zinco e potássio também se mostraram superiores. Isso provavelmente ocorreu devido ao menor volume de água do escoamento superficial em comparação aos mesocosmos, tornando os metais mais concentrados no primeiro caso.

Tabela 17 – Quantificação de metais nas amostras de água do escoamento superficial

Metais (mg/L)	Tratamento		
	PE	PI	C
Alumínio (Al)	11,463	44,006	3,560
Bário (Ba)	0,242	0,235	0,182
Cromo (Cr)	0,001	0,011	0,000
Cobre (Cu)	0,014	0,031	0,050
Manganês (Mn)	0,195	0,240	0,035
Molibdênio (Mo)	0,000	0,000	0,003
Estrôncio (Sr)	0,011	0,026	0,006
Zinco (Zn)	0,770	0,877	0,405
Potássio (K)	3,623	19,811	5,286

Fonte: Autoria própria

5.2.5 Índice do Estado Trófico (IET)

A eutrofização consiste no enriquecimento de águas superficiais por nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, levando ao crescimento excessivo das plantas aquáticas, (planctônicas ou aderidas), com conseqüente desequilíbrio do ecossistema aquático e progressiva deterioração da qualidade da água dos corpos lânticos (FIGUEIRÊDO et al., 2007). A fim de avaliar o grau de eutrofização dos mesocosmos, classificou-se o estado

trófico de cada mesocosmo, determinados a partir das concentrações de clorofila *a* e fósforo total, conforme mostrado na Tabela 18.

Tabela 18 – Classificação do estado trófico dos mesocosmos (coleta de janeiro/2020)

Tratamento	Clorofila <i>a</i> (µg/L)	Fósforo total (µg/L)	IET (Reservatórios)	Classificação
PE1	3,2	61,7	55,9	Mesotrófico
PE2	9,7	157,2	61,5	Eutrófico
PE3	5,3	173,4	60,3	Eutrófico
PE4	0,7	106,4	54,4	Mesotrófico
PI1	4,6	182,4	60,1	Eutrófico
PI2	7,7	105,6	59,7	Eutrófico
PI3	7,2	215,3	61,7	Eutrófico
PI4	8,9	283,1	63,1	Supereutrófico
PI5	3,8	184,8	59,1	Eutrófico
C1	7,2	368,8	63,3	Supereutrófico
C2	35,1	203,6	65,4	Supereutrófico
C4	19,1	76,0	61,0	Eutrófico
C5	7,3	107,4	60,0	Eutrófico

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; IET – Índice do Estado Trófico.

Fonte: Autoria própria

O aumento das concentrações desses nutrientes nas águas naturais pode ocorrer de forma natural ou acelerada pelas atividades antrópicas, por exemplo por meio do aporte de esgotos, resíduos industriais (fonte pontual) e agropecuários (fonte difusa) (SOUZA et al., 2014). A poluição difusa advinda das atividades de agricultura e pecuária resultam no aumento de nutrientes (principalmente fósforo e nitrogênio) em corpos d’água provenientes do uso de fertilizantes e da decomposição das excretas animais (CARPENTER et al., 1998; TARANU; GREGORY-EAVES, 2008). O escoamento superficial, associado à erosão de solos ricos em fósforo, tem um papel fundamental no transporte de nutrientes para os corpos hídricos, estimando-se que cerca de 10% de todo o fósforo seja transportado do solo para as águas superficiais em áreas agrícolas (BOUWMAN; BEUSEN; BILLEN, 2009). Esse transporte é influenciado por fatores como: potencial erosivo do solo, precipitação, atividades de agricultura e pecuária, aplicação de fertilizantes, urbanização e composição química do solo (REKOLAINEN et al., 2006).

Observa-se que os únicos mesocosmos que não se encontram eutrofizados são o dos *plots* PE1 e PE4, uma vez que a classificação de “mesotrófico”, indicando que o corpo d’água possui produtividade intermediária, com possíveis implicações sobre a qualidade da água, mas

em níveis aceitáveis (Tabela 6). Os mesocosmos com maior grau de eutrofização são o PI4, C1 e C2, classificados como “supereutróficos”, que indica alta produtividade em relação às condições naturais, baixa transparência e alterações frequentes indesejáveis na qualidade da água, como a ocorrência de florações de algas (LAMPARELLI, 2004). Observou-se anteriormente na PCA (Figura 24) que os mesocosmos PI4, C1 e C2 apresentaram alta relação com os nutrientes, tanto nitrogenados quanto os fosfatados. Conforme discutido anteriormente, as altas concentrações de nutrientes e clorofila provavelmente foram influenciadas pela fertilização utilizados no solo e decomposição das macrófitas.

Além disso, a quantificação de nutrientes no escoamento superficial (Tabela 15) mostra que as maiores concentrações de nutrientes fosfatados foram obtidas nos tratamentos PI (1971 µg/L) e C (1369 µg/L), coincidindo com o maior grau de eutrofização para esses usos do solo. Também se observa que, apesar de o tratamento PE não ter recebido fertilizantes, a concentração de fósforo total no escoamento superficial desse tratamento também foi elevada (833 µg/L), e os mesocosmos inseridos nos *plots* PE2 e PE3 se encontram eutrofizados, provavelmente devido ao aporte de nutrientes advindo das excretas animais no período da pastagem do gado, à decomposição das macrófitas e presença de algas.

5.3 ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS (AGOSTO/2020)

Neste tópico estão descritos os resultados das análises físicas, químicas e biológicas, referentes a coleta realizada em agosto/2020.

5.3.1 Parâmetros medidos *in loco*

A Tabela 19 refere-se aos diferentes tratamentos e contém os resultados das variáveis físicas, químicas e biológicas das amostras de água dos mesocosmos, coletadas no dia 12 de agosto de 2020. O dia estava ensolarado e sem vento, e notou-se que a área estava muito seca devido à falta de chuva.

Tabela 19 – Variáveis físicas, químicas e biológicas (clorofila) das águas dos mesocosmos (coleta de agosto/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05

Variável	Tratamento																Valor estabelecido para águas doces na CONAMA 357 (BRASIL, 2005)
	PE1	PE2	PE3	PE4	$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	PI1	PI2	PI3	PI4	PI5	$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	C1	C2	C4	C5	$\bar{X}_C \pm \sigma$	
Temperatura (°C)	16,0	16,0	17,3	17,0	16,6±0,7	17,0	16,7	17,6	17,4	17,2	17,2±0,4	16,2	16,2	17,7	17,5	16,9±0,8	-
pH	6,3	6,2	6,1	5,9	6,1±0,2	6,3	6,1	6,0	6,1	6,0	6,1±0,1	6,4	7,3	6,1	5,8	6,4±0,7	6 a 9
Condutividade (µS/cm)	5,0	6,7	7,3	7,7	6,7±1,2	11,2	8,3	10,6	12,0	60,6	20,5±22,4	9,5	12,9	8,0	9,7	10,0±2,1	<100
OD (mg/L)	4,9	4,1	3,6	2,9	3,9±0,9	2,9	4,2	5,0	2,8	3,0	3,6±1,0	3,8	2,4	5,4	2,5	3,6±1,4	≥6 (Classe 1), ≥5 (Classe 2), ≥4 (Classe 3), ≥2 (Classe 4)
% saturação de OD	49,3	41,4	36,6	29,4	39,2±8,4	29,8	42,8	51,3	28,5	31,0	36,7±10,0	39,0	24,2	56,4	26,2	36,5±14,8	-
Turbidez (UNT)	2,5	29,0	13,2	503,4	137±244,5	6,17	28,0	9,2	11,2	131,0	37,1±53,2	66,5	7,2	18,2	6,5	24,6±28,4	<40 (Classe 1), <100 (Classe 2 e 3)
Clorofila a (µg/L)	7,7	8,5	75,8	38,2	32,5±32,1	31,0	40,0	29,1	21,9	23,2	29,1±7,2	33,6	57,6	27,1	24,3	35,7±15,1	<10 (Classe 1), <30 (Classe 2), <60 (Classe 3)
Clorofila b (µg/L)	7,0	5,4	80,4	29,2	30,5±35,0	29,3	50,5	20,9	16,4	16,3	26,7±14,3	25,3	65,0	32,4	28,4	37,8±18,4	-
Dureza (mgCaCO₃/L)	2,0	4,0	2,0	4,0	3,0±1,2	6,0	6,0	4,0	8,0	4	5,6±1,7	6,0	4,0	6,0	4,0	5,0±1,2	-

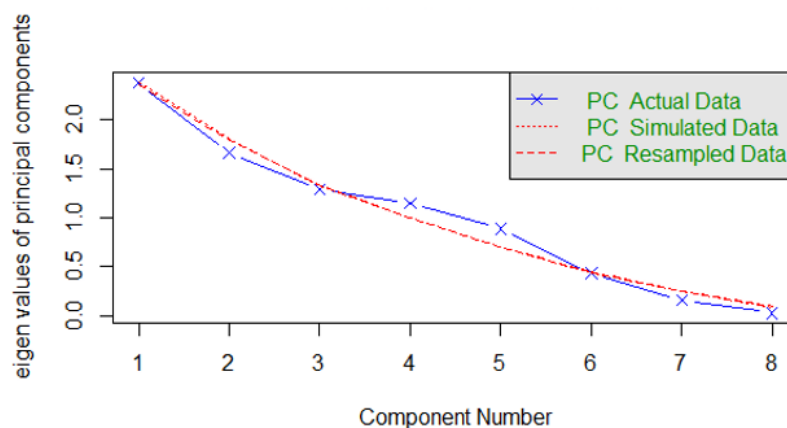
Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; OD – oxigênio dissolvido; \bar{X} – média; σ – desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

Em comparação com a coleta de janeiro, as variáveis que mais se diferiram nesta coleta foram: temperaturas menores (condizente com a estação do ano), menores valores de condutividade (provavelmente pelo tempo decorrido desde a aplicação de agroquímicos) e maiores valores de OD, turbidez e clorofila. Apenas nas amostras PE4 (5,85) e PI3 (5,92) e C5 (5,75) foi medido pH abaixo da faixa estabelecida pela CONAMA nº357/2005. Já o OD não foi quantificado abaixo de 2 mg/L em nenhuma amostra, o que ocorreu na primeira coleta. Quanto à turbidez, 10 amostras se enquadram no limite estabelecido para águas de Classe 1 (40 UNT), exceto os tratamentos PE4 (503 UNT), PI5 (131 UNT) e C1 (66,5 UNT). Para o limite estabelecido para Classes 2 e 3 (<100 UNT), os mesocosmos dos *plots* PE4 e PI5 ultrapassaram o limite da legislação. A clorofila a também foi quantificada acima do valor permitido (60 µg/L para Classe 3) no mesocosmo PE3 (80,36 µg/L).

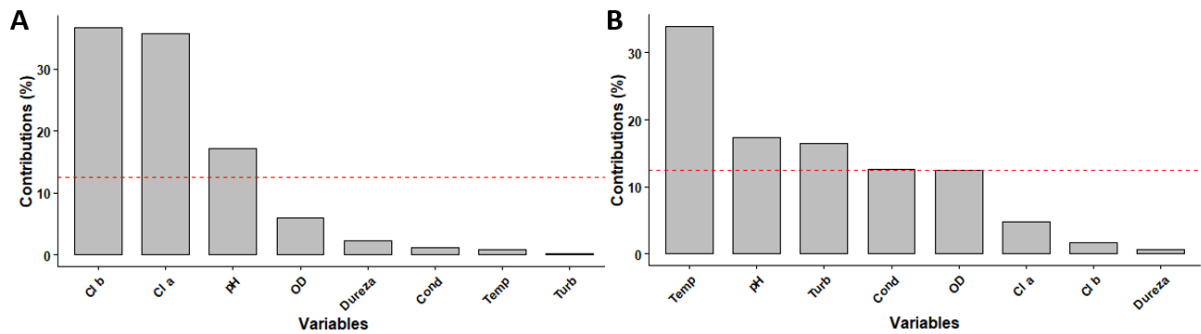
A Figura 30 apresenta a PCA para os parâmetros físicos, químicos e biológicos medidos *in loco* nos mesocosmos durante a coleta de agosto/2020. Os eixos 1 e 2 explicam, respectivamente, 29,7 e 20,8% da variância dos dados, totalizando 50,5%. A Figura 28 Figura 31e a Figura 29 auxiliam na interpretação da PCA, mostrando, respectivamente, o componente principal mais significativo (PC1) para explicar os dados e as contribuições de cada variável da PC1 e PC2.

Figura 28 – Gráfico de análise de parâmetros *in situ* que reteve o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (coleta de agosto/2020)



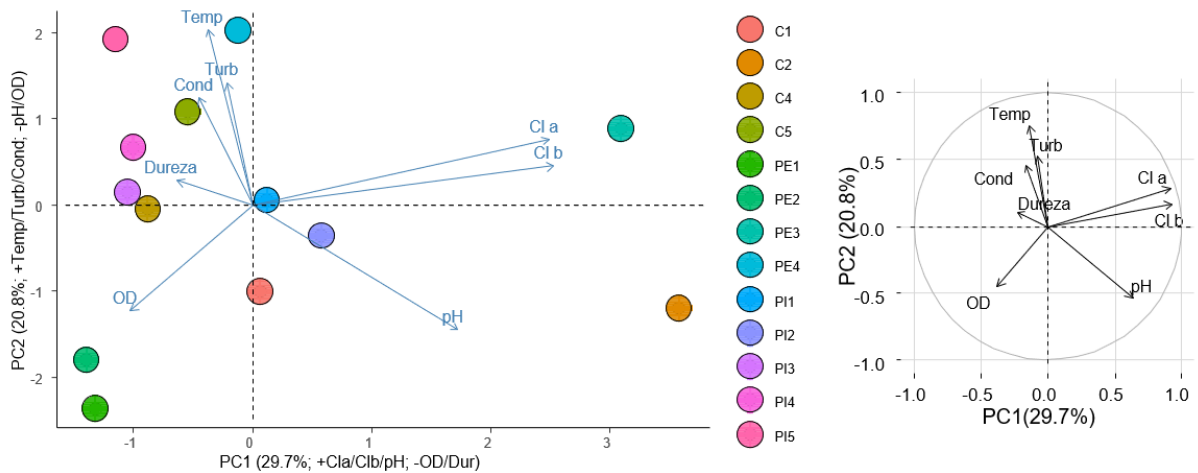
Fonte: Autoria própria

Figura 29 – Contribuições das variáveis (%) para PC1 (A) e PC2 (B). As variáveis analisadas foram condutividade, dureza, temperatura, clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl *b*), pH, oxigênio dissolvido (OD) e turbidez (coleta de agosto/2020)



Fonte: Autoria própria

Figura 30 – Diagrama da PCA para as variáveis físicas, químicas e biológicas medidas *in loco* nos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de agosto/2020)



Fonte: Autoria própria

Os mesocosmos se mostraram dispersos espacialmente no gráfico. O *plot* C2 mostrou-se altamente relacionado com o pH e com as clorofilas *a* e *b*, que são as variáveis mais representativas da PC1. Esse comportamento também foi observado na análise de janeiro, mas nesta os pontos se concentraram no quarto quadrante, cujas variáveis possuem maior porcentagem de explicação da variância dos dados. Do pasto extensivo, os mesocosmos dos *plots* PE1 e PE2 apresentaram valores baixos para as variáveis de ambos os eixos, provavelmente devido ao menor grau de intervenção nessa área, enquanto o PE3 mostrou uma grande influência das clorofilas, podendo estar relacionado à decomposição das macrófitas. Na PC2, o mesocosmo que apresentou maior relação com a dureza foi o PI4.

Os modelos ecossistêmicos foram construídos em 2018, portanto deve-se levar em conta o ciclo das macrófitas aquáticas que foram introduzidas nos mesocosmos, ou seja, a proliferação e decomposição. Também deve-se levar em conta o clima, uma vez que a tendência das macrófitas é se multiplicarem no verão e se morrerem no inverno (BEYRUTH, 1992). Além disso, com o baixo índice de precipitação no inverno, o nível de água dos mesocosmos diminuiu, tornando os nutrientes mais concentrados. As espécies utilizadas (*Salvinia auriculata*, *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes*) são flutuantes, portanto, formam uma espécie de “tapete” na lâmina d’água, causando menor infiltração de luz e maior consumo de oxigênio e liberação de nutrientes acumulados devido a decomposição. A clorofila *a* é indicadora da biomassa fitoplanctônica, ou seja, um indicador do crescimento de algas e cianobactérias devido ao enriquecimento por nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (CETESB, 2014). Portanto, a maior representatividade das clorofilas na coleta de agosto provavelmente decorre da decomposição das macrófitas, que causaram aumento na concentração de nutrientes a serem assimilados pelas algas e, conseqüentemente, aumento dos valores de clorofila.

5.3.2 Agrotóxicos em amostras de água e sedimento dos mesocosmos

Na Tabela 20 são apresentados os resultados da quantificação de agrotóxicos em cada mesocosmo. A maior concentração de 2,4-D encontrada foi no mesocosmo PE3 (54 ng/L), porém, no tratamento PI, o mesmo agrotóxico foi quantificado em um maior número de amostras, com concentrações de 46,4 ng/L (PI1), 20,1 ng/L (PI2) e 29 ng/L (PI5). Todas as concentrações de 2,4-D estão abaixo do limite estabelecido pelo CONAMA n°357/2005 para as 3 classes de água doce. O fipronil e seus produtos foram mais recorrentes e em maior concentração no tratamento C, o qual recebeu a aplicação do produto em novembro/2019.

Tabela 20 – Quantificação de agrotóxicos nos mesocosmos (coleta de agosto/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05

Tratamento	Agrotóxico (ng/L)			
	2,4-D	Fipronil	Fipronil Sulfide	Fipronil Sulfona
PE1	<LQ	1,4	<LQ	0,3
PE2	<LQ	0,6	<LQ	0,2
PE3	54,0	0,8	<LQ	0,2
PE4	<LQ	0,9	<LQ	0,2
$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	13,5±27,0	0,9±0,3	0,0±0,0	0,2±0,0
PI1	46,4	1,4	<LQ	0,4
PI2	20,1	0,9	<LQ	0,2
PI3	<LQ	0,7	<LQ	0,3
PI4	<LQ	0,8	<LQ	0,6
PI5	29,0	0,6	<LQ	0,5
$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	19,1±19,8	0,9±0,3	0,0±0,0	0,4±0,2
C1	<LQ	1,1	<LQ	0,7
C2	<LQ	2,0	0,5	1,1
C4	<LQ	1,6	0,7	2,6
C5	<LQ	0,9	<LQ	0,8
$\bar{X}_C \pm \sigma$	0,0±0,0	1,4±0,5	0,3±0,4	1,3±0,9
Valores estabelecidos para águas doces na CONAMA 357 (BRASIL, 2005)	<4000 ng/L (Classes 1 e 2), <30000 ng/L (Classe 3)	-	-	-

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; LQ – limite de quantificação (2,4-D: 5 ng/L; Fipronil: 0,5 ng/L; Fipronil Sulfide: 0,5 ng/L; Fipronil Sulfona: 0,1 ng/L); \bar{X} – média; σ – desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

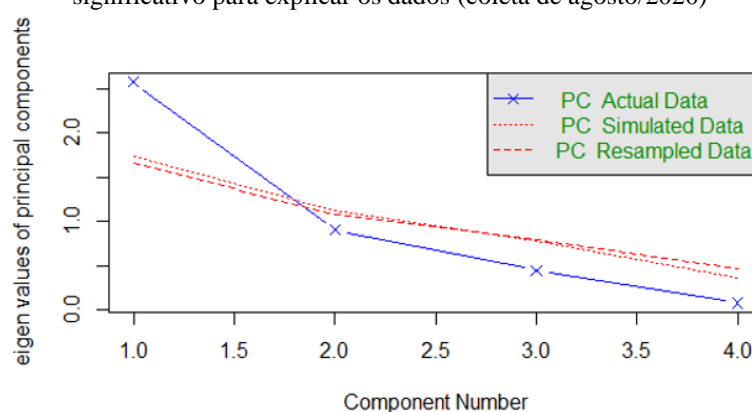
Ao comparar as variáveis climatológicas entre as duas datas, a semana antecedente à coleta de janeiro apresentou valores altos de precipitação, opondo-se à ausência de chuva observada no mês de agosto (Figura 11). O volume, a intensidade e a frequência de precipitação influenciam significativamente no transporte e na perda de agrotóxicos através do escoamento superficial e da percolação da água no solo (SPADOTTO, 2006). Andrade et al. (2021) constataram experimentalmente que o evento de chuva tem um efeito substancial na qualidade da água de córregos próximos às áreas de cultivo de soja, causando aumento na turbidez, nutrientes (principalmente amônio) e concentração de agrotóxicos. Portanto, justificam-se as concentrações mais altas de agrotóxicos quantificadas em janeiro/2020, dada

a proximidade à data de aplicação dos produtos no solo e a maior ocorrência de precipitação nessa época, causando o maior aporte de resíduos de agrotóxicos no interior dos mesocosmos. Além disso, o estágio das culturas também pode afetar o escoamento de agrotóxicos e nutrientes, uma vez que os produtos aplicados e a cobertura do solo diferem em cada etapa do cultivo (ANDRADE et al., 2021). Portanto, a maior concentração de nutrientes e agrotóxicos na primeira coleta também pode estar relacionado à menor cobertura do solo.

As concentrações de agrotóxicos quantificadas entre as duas coletas foram significativamente menores, principalmente em relação ao 2,4-D. No entanto, transcorreram-se aproximadamente 9 meses desde a aplicação dos agrotóxicos na área, e o fato de ainda estarem presentes nas amostras de água pode indicar a persistência dos produtos no ambiente, principalmente o fipronil. A solubilidade do fipronil em água é considerada baixa (1,90 mg/L à 25°C e pH 5), porém possui alta persistência no solo (meia-vida de 8,78 a 33 dias) e alta afinidade por matéria orgânica (PINTO et al., 2021).

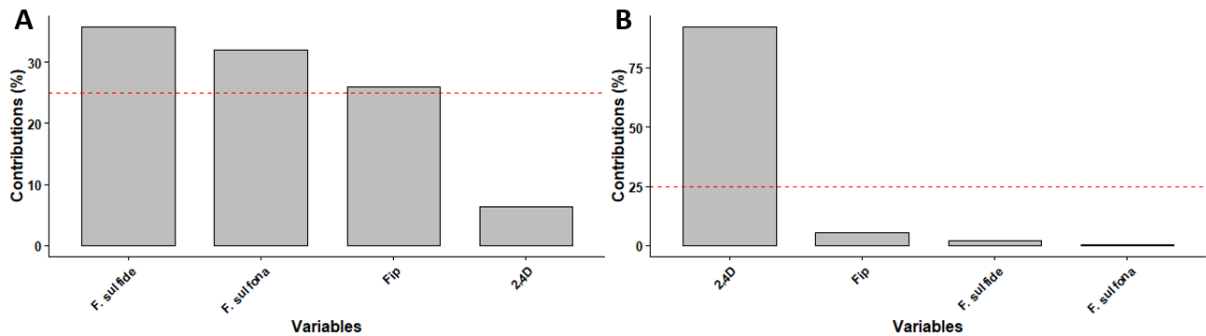
A Figura 33 apresenta a Análise de Componentes Principais (PCA) para os agrotóxicos quantificados nas amostras de água dos mesocosmos, referente à coleta de agosto/2020. Os eixos 1 e 2 explicam, respectivamente, 64,4 e 22,5% da variância dos dados, totalizando 86,9%. A Figura 31 e a Figura 32 auxiliam na interpretação da PCA, mostrando, respectivamente, o componente principal mais significativo (PC1) para explicar os dados e as contribuições de cada variável da PC1 e PC2.

Figura 31 – Gráfico de análise de agrotóxicos que reteve o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (coleta de agosto/2020)



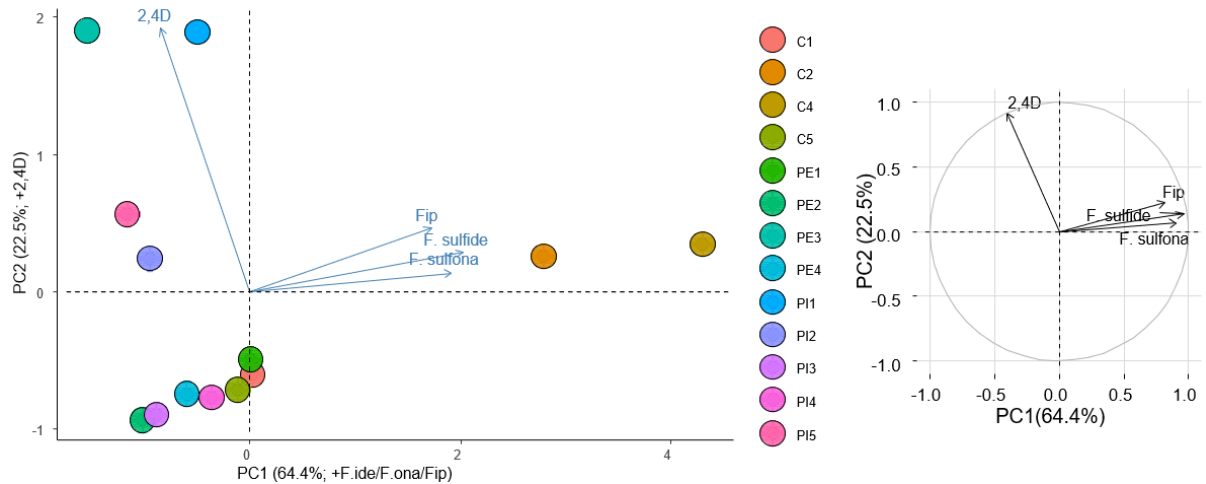
Fonte: Autoria própria

Figura 32 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1 e (B) PC2. As variáveis analisadas foram fipronil, fipronil sulfona, fipronil sulfide e 2,4-D (coleta de agosto/2020)



Fonte: Autoria própria

Figura 33 – Diagrama da PCA para os agrotóxicos quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de agosto/2020)



Fonte: Autoria própria

Observa-se que os mesocosmos inseridos nos *plots* da cana-de-açúcar, principalmente C2 e C4, apresentaram os maiores valores associados às variáveis do eixo 1 (fipronil, fipronil sulfide e fipronil sulfona). Em comparação à coleta de janeiro, o mesocosmo C4 se tornou menos influenciado pelo 2,4-D. Isso pode ser explicado pelo tempo decorrido entre a aplicação dos agrotóxicos e a segunda coleta, que causou decaimento na concentração de 2,4-D nas amostras de água e maior persistência de fipronil e seus produtos de degradação no ambiente. Com exceção do PE3, os mesocosmos dos *plots* do pasto extensivo se concentram no terceiro quadrante, apresentando os menores valores associados aos agrotóxicos. Esse comportamento era esperado e foi observado na PCA de janeiro, dado que a área de PE não recebeu aplicação de produtos agroquímicos. A maior relação com o 2,4-D ocorreu com as

amostras do PE3 e PI1 que, conforme visto anteriormente, apresentaram as maiores concentrações do herbicida.

A Tabela 21 resume a quantificação de agrotóxicos em amostras de sedimento dos mesocosmos. O 2,4-D foi quantificado apenas em uma das amostras (1335,6 ng/g, PE2). Em comparação com a coleta de janeiro/2020, as concentrações encontradas de fipronil reduziram significativamente, provavelmente pelo tempo decorrido entre as duas coletas. No entanto, o fato de o fipronil e fipronil sulfona ainda serem detectados nas amostras é indicativo da persistência desses produtos no ambiente.

Tabela 21 – Quantificação de agrotóxicos no sedimento dos mesocosmos (coleta de agosto/2020)

Tratamento	Agrotóxico			
	2,4-D (ng/g)	Fipronil (pg/g)	Fipronil Sulfide (pg/g)	Fipronil Sulfona (pg/g)
PE1	<LQ	1,1	<LQ	0,2
PE2	135,6	<LQ	<LQ	0,2
PE3	<LQ	<LQ	<LQ	0,1
PE4	<LQ	0,1	<LQ	0,1
$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	33,9±67,8	0,3±0,5	0,0±0,0	0,15±0,1
PI1	<LQ	0,1	<LQ	<LQ
PI2	<LQ	0,8	<LQ	0,1
PI3	<LQ	1,1	<LQ	0,1
PI4	<LQ	<LQ	<LQ	0,1
PI5	<LQ	0,7	<LQ	0,2
$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	0,0±0,0	0,54±0,5	0,0±0,0	0,1±0,1
C1	<LQ	0,1	<LQ	0,2
C2	<LQ	0,5	<LQ	0,6
C5	<LQ	1,2	<LQ	0,3
C5	<LQ	<LQ	<LQ	0,2
$\bar{X}_C \pm \sigma$	0,0±0,0	0,45±0,5	0,0±0,0	0,3±0,2

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; LQ – limite de quantificação (2,4-D: 0,75 ng/g; Fipronil: 0,015 ng/g; Fipronil Sulfide: 0,075 ng/g; Fipronil Sulfona: 0,015 ng/g); \bar{X} – média; σ – desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

Lin et al. (2009) avaliaram a persistência dos degradados de fipronil em amostras de sedimento de rios urbanos. Em condições anaeróbicas, a meia-vida do fipronil encontrada foi de 18,5 dias, enquanto fipronil sulfide e fipronil sulfona apresentaram meia-vida de 588 e 712

dias, respectivamente. Sob condições facultativas, a meia-vida do fipronil aumentou para 62 dias, e para sulfide e sulfona foram determinados 301 e 502 dias, respectivamente. A alta persistência dos subprodutos implica significativamente nos ecossistemas, uma vez que a estabilidade desses compostos prolonga significativamente os efeitos tóxicos após a aplicação do fipronil, mesmo que o produto pareça ter se dissipado no ambiente (LIN et al., 2009).

5.3.3 Nutrientes

A Tabela 22 sintetiza a quantificação de nutrientes nas amostras de água dos mesocosmos dos três tratamentos de solo (PE, PI e C, respectivamente). Observa-se que para todos os tratamentos, o fósforo total é o nutriente que ocorre em maior quantidade, com a maior concentração quantificada nos mesocosmos dos *plots* C1 (332 µg/L) e PI5 (314 µg/L). Assim como na coleta de janeiro/2020, todas as amostras ultrapassaram o limite de PT para todas as classes de enquadramento de corpos d'água lênticos.

Quanto ao nitrogênio total, os mesocosmos cujas amostras ultrapassaram o valor máximo estabelecido de 1270 µg/L (Classes 1 e 2, lêntico) são o PE2 (1630 µg/L), PE3 (1350 µg/L), PI2 (1490 µg/L), PI3 (1730 µg/L), PI4 (1680 µg/L), PI5 (1870 µg/L), C1 (1450 µg/L), C4 (1630 µg/L) e C5 (1960 µg/L). Para nitrito e nitrato, todas as amostras possuem concentrações abaixo do máximo permitido. Também se observou que na coleta de janeiro/2020 as concentrações de silicato foram menores do que em agosto, sendo que o maior valor quantificado na primeira foi de 1610 µg/L, enquanto na segunda foi de 1060 µg/L, ambos no mesocosmo PI5. Isso provavelmente ocorreu devido à estiagem do inverno, gerando menos perda do mineral presente no solo.

Tabela 22 – Quantificação de nutrientes das amostras de água dos mesocosmos (coleta de agosto/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05

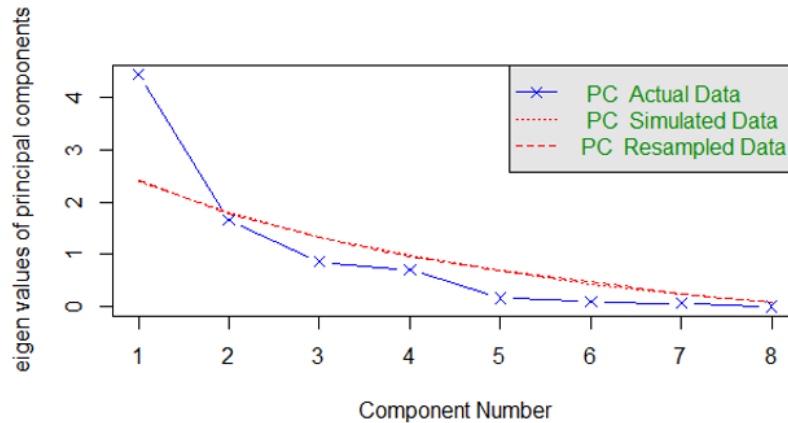
Variáveis (µg/L)	Tratamento																Valor estabelecido para águas doces na CONAMA 357 (BRASIL, 2005)
	PE1	PE2	PE3	PE4	$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	PI1	PI2	PI3	PI4	PI5	$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	C1	C2	C4	C5	$\bar{X}_C \pm \sigma$	
NT (Nitrogênio total)	890	1630	1350	960	1207,5±346,8	980	1490	1730	1680	1870	1550±346,5	1450	1170	1630	1960	1552,5±331,1	Lêntico: ≤1270 (Classes 1 e 2)
NO₂⁻ (Nitrito)	1,3	2,3	4,7	4,8	3,3±1,7	2,7	2,8	3,3	3,2	4,9	3,4±0,9	2,0	2,6	2,8	2,9	2,6±0,4	≤1000
NO₃⁻ (Nitrato)	41,6	48,7	152,2	168,5	102,7±66,9	73,2	89,7	99,7	87,0	86,0	87,1±9,5	67,5	68,9	87,3	69,8	73,4±9,3	≤10000
NH₄⁺ (Íon amônio)	4,5	5,5	16,0	13,2	9,8±5,7	10,0	7,5	11,5	17,2	58,9	21±21,5	5,4	14,9	11,0	16,9	12±5,1	-
PT (Fósforo total)	77,3	143,9	272,6	155,3	162,3±81,2	163,7	169,6	250,9	310,2	314,3	241,7±73,0	332,2	253,6	117,8	128,4	208±103,3	Lêntico: ≤20 (Classe 1), ≤30 (Classe 2), ≤50 (Classe 3)
Pi (Fosfato inorgânico)	4,1	5,6	10,6	9,0	7,3±3,0	9,1	3,4	11,2	15,8	45,7	17±16,6	23,2	4,1	8,8	5,5	10,4±8,8	-
PTD (Fósforo total dissolvido)	12,8	16,6	21,7	19,6	17,7±3,9	37,7	21,4	33,8	38,9	73,8	41,1±19,5	41,0	24,2	25,5	26,9	29,4±7,8	-
SiO₂ (Silicato)	370	160	320	540	347,5±156,5	280	410	610	360	1060	544±313,1	200	270	550	330	337,5±151,3	-

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; \bar{X} – média; σ – desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

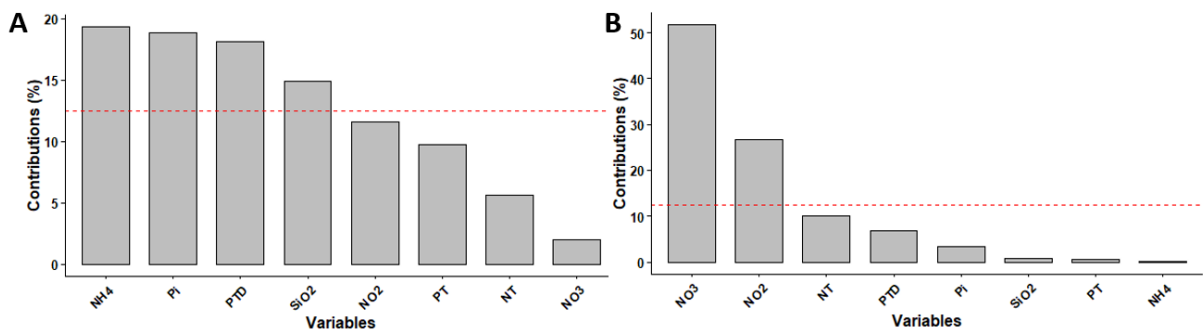
A Figura 36 apresenta a PCA para os nutrientes quantificados nas amostras de água dos mesocosmos, referente à coleta de agosto/2020. Os eixos 1 e 2 explicam, respectivamente, 55,5 e 20,7% da variância dos dados, totalizando 76,2%. A Figura 34 e a Figura 35 auxiliam na interpretação da PCA, mostrando, respectivamente, o componente principal mais significativo (1) para explicar os dados e as contribuições de cada variável da PC1 e PC2.

Figura 34 – Gráfico de análise de nutrientes que reteve o primeiro componente principal como mais significativo para explicar os dados (coleta de agosto/2020)



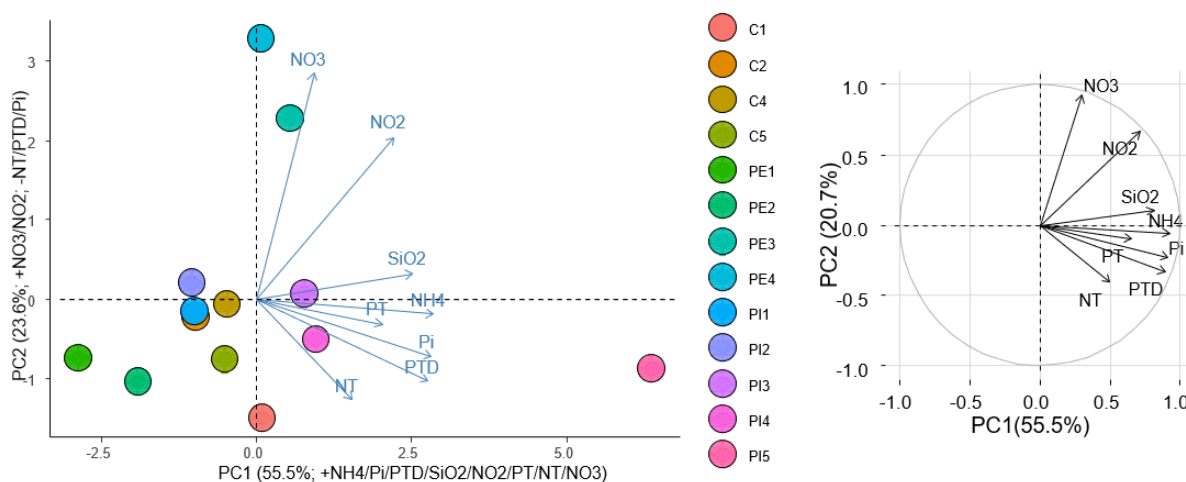
Fonte: Autoria própria

Figura 35 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1 e (B) PC2. As variáveis analisadas foram fósforo total dissolvido (PTD), fósforo inorgânico (Pi), silicato (SiO_2), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), nitrogênio total (NT), fósforo total (PT) e íon amônio (NH_4^+) (coleta de agosto/2020)



Fonte: Autoria própria

Figura 36 – Diagrama da PCA para os nutrientes quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de agosto/2020)



Fonte: Autoria própria

Através da localização dos pontos no diagrama não é possível observar um padrão para os tratamentos de solo. Em comparação com a coleta de janeiro, os mesocosmos dos *plots* da cana-de-açúcar apresentaram baixa relação com os nutrientes, provavelmente pelo período de tempo decorrido entre as duas coletas desde a aplicação dos produtos agroquímicos, uma vez que o intervalo de tempo de aplicação de fertilizantes influencia a retirada de nutrientes dissolvidos, diminuindo progressivamente à medida que se aumenta o período desde o momento da aplicação (LI et al., 2020). Dentre as amostras de pasto extensivo, o PE3 e o PE4 mostraram-se influenciados nitrito e nitrato. Já os mesocosmos P13, P14 e P15 apresentaram relação com as variáveis mais explicativas (íon amônio, NT, PT, PTD e silicato). Conforme discutido anteriormente, as altas concentrações de nitrogênio e fósforo nos mesocosmos podem ser resultado da decomposição das macrófitas, enquanto o silicato provavelmente provém da perda deste mineral pelo solo, o qual provavelmente atingiu os mesocosmos por meio do escoamento superficial, mas de forma menos significativa do que ocorreu em janeiro/2020.

5.3.4 Metais

A Tabela 23 sintetiza a quantificação de metais nas amostras de água dos mesocosmos. Tal como a coleta de janeiro, os metais encontrados em maior quantidade foram alumínio, bário, zinco e potássio. A maior concentração de alumínio obtida foi de 1,9 mg/L no

PI4. O zinco foi encontrado em maior quantidade no C1 (0,532 mg/L). Já a concentração de potássio foi maior no mesocosmo do *plot* PI5 (17,9 mg/L).

Para o bário, nenhuma amostra excedeu os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA n°357/2005, definidos como 0,7 mg/L (Classes 1 e 2) e 1 mg/L (Classe 3). Para o alumínio, todas as amostras apresentaram concentrações superiores ao limite de 0,2 mg/L (corpos d'água de Classe 3). Os valores máximos para o zinco são de 0,18 mg/L (Classes 1 e 2) e 5 mg/L (Classe 3), portanto 7 amostras excederem o limite da menor concentração: PE1 (0,228 mg/L), PE4 (0,223 mg/L), PI3 (0,188 mg/L), PI4 (0,217 mg/L), C1 (0,562 mg/L), C2 (0,216 mg/L) e C4 (0,214 mg/L). Para o cobre, a Resolução estabelece os limites de 0,009 mg/L (Classes 1 e 2) e 0,013 mg/L (Classe 3), portanto apenas o PE3 se encontra dentro do limite para corpos d'água de Classes 1 e 2, somando-se aos mesocosmos dos *plots* PI1 e PI2 para Classe 3. Quanto ao cádmio, todas as amostras se encontram dentro do limite para águas de Classe 3 ($\leq 0,01$ mg/L), porém, para Classe 1 e 2, todas as amostras excedem o valor máximo permitido de 0,001 mg/L. Para os demais metais que possuem limite estabelecido por legislação, como cobalto, cromo, manganês e níquel, as amostras se encontram abaixo dos valores máximos permitidos.

Tabela 23 – Quantificação de metais nas amostras de água dos mesocosmos (coleta de agosto/2020) e valores estabelecidos para água doce na CONAMA 357/05

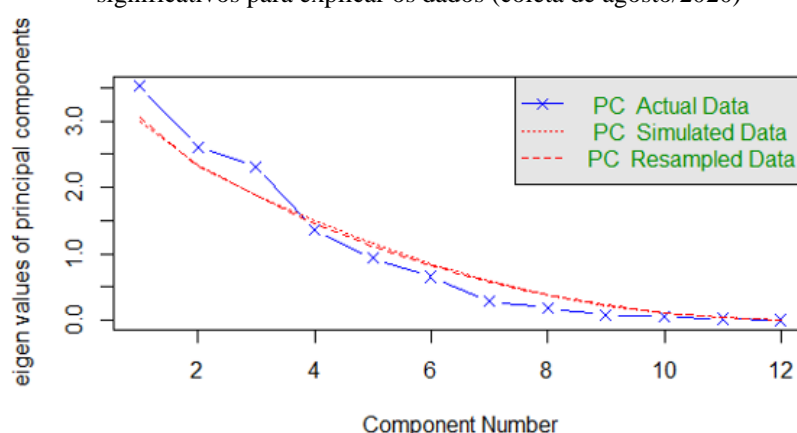
Metais (mg/L)	Tratamento																Valor estabelecido para águas doces na CONAMA 357 (BRASIL, 2005)
	PE1	PE2	PE3	PE4	$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	PI1	PI2	PI3	PI4	PI5	$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	C1	C2	C4	C5	$\bar{X}_C \pm \sigma$	
Alumínio (Al)	0,847	1,366	0,983	0,659	0,964±0,299	0,548	0,610	0,878	1,896	0,672	0,921±0,559	0,638	0,522	0,244	0,425	0,457±0,167	≤0,1 (Classes 1 e 2), ≤0,2 (Classe 3)
Bário (Ba)	0,202	0,178	0,181	0,200	0,190±0,013	0,176	0,202	0,175	0,183	0,192	0,186±0,011	0,391	0,212	0,193	0,190	0,247±0,097	≤0,7 (Classes 1 e 2), ≤1,0 (Classe 3)
Cádmio (Cd)	0,011	0,011	0,006	0,008	0,009±0,002	0,008	0,007	0,007	0,007	0,006	0,007±0,001	0,009	0,007	0,005	0,007	0,007±0,002	≤0,001 (Classes 1 e 2), ≤0,01 (Classe 3)
Cobalto (Co)	0,050	0,011	0,000	0,000	0,015±0,024	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000	0,002	0,003	0,000	0,000	0,001±0,002	≤0,05 (Classes 1 e 2), ≤0,2 (Classe 3)
Cromo (Cr)	0,022	0,003	0,004	0,008	0,009±0,009	0,001	0,001	0,002	0,003	0,001	0,002±0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001±0,000	≤0,05
Cobre (Cu)	0,024	0,016	0,008	0,016	0,016±0,007	0,011	0,010	0,026	0,051	0,008	0,021±0,018	0,016	0,013	0,015	0,022	0,017±0,004	≤0,009 (Classes 1 e 2), ≤0,013 (Classe 3)
Manganês (Mn)	0,023	0,062	0,064	0,114	0,066±0,037	0,046	0,059	0,050	0,046	0,049	0,050±0,005	0,111	0,090	0,023	0,049	0,068±0,040	≤0,1 (Classes 1 e 2), ≤0,5 (Classe 3)
Molibdênio (Mo)	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000±0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000	-
Níquel (Ni)	0,007	0,000	0,000	0,157	0,041±0,077	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,002±0,004	0,001	0,006	0,000	0,000	0,002±0,003	≤0,025
Estrôncio (Sr)	0,008	0,007	0,007	0,008	0,008±0,001	0,012	0,008	0,012	0,016	0,004	0,010±0,005	0,011	0,012	0,006	0,007	0,009±0,003	-
Zinco (Zn)	0,228	0,136	0,110	0,223	0,174±0,060	0,107	0,178	0,188	0,217	0,169	0,172±0,040	0,562	0,216	0,214	0,125	0,279±0,193	≤0,18 (Classes 1 e 2), ≤5,0 (Classe 3)
Potássio (K)	0,974	1,076	1,692	1,547	1,322±0,351	0,863	0,887	1,041	0,910	17,991	4,338±7,632	1,514	1,697	0,938	1,271	1,355±0,328	-

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; \bar{X} – média; σ – desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

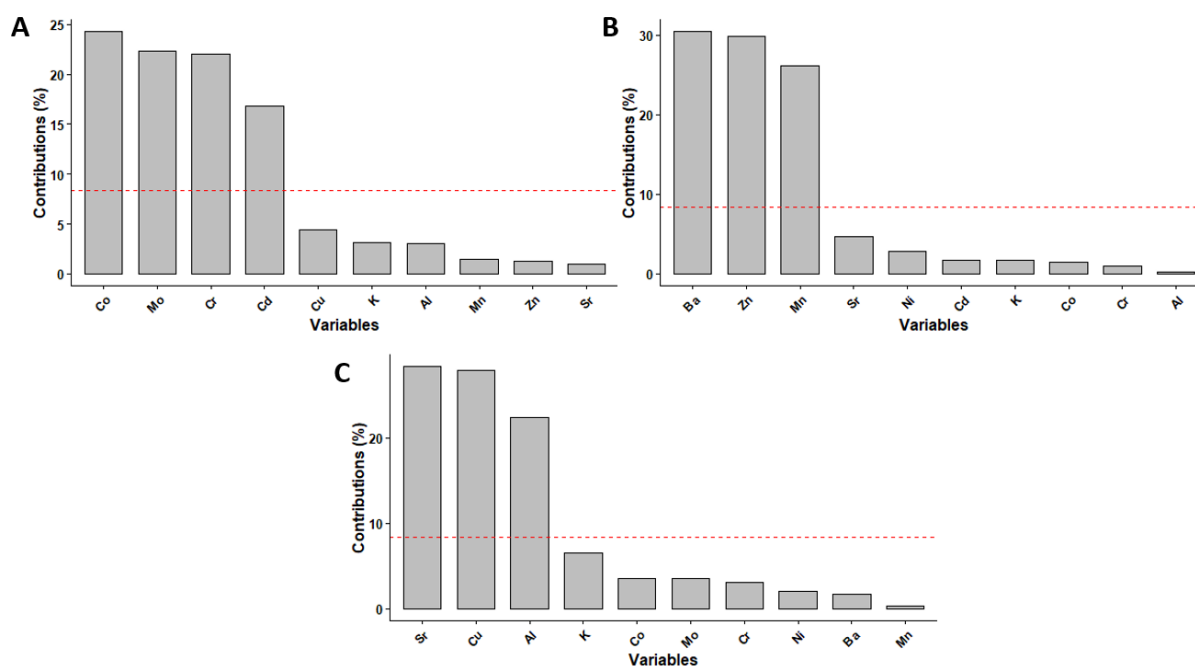
A Figura 39 apresenta a PCA para os metais quantificados nas amostras de água dos mesocosmos, referente à coleta de agosto/2020. Os eixos 1 e 2 explicam, respectivamente, 29,8 e 24% da variância dos dados, totalizando 53,8%. A Figura 40 apresenta a PCA para os eixos 1 e 3, explicando, respectivamente, 29,8 e 18,7% da variância, totalizando 48,5%. A Figura 37 e a Figura 38 auxiliam na interpretação da PCA, mostrando, respectivamente, os componentes principais mais significativos (1, 2 e 3) para explicar os dados, e as contribuições de cada variável da PC1, PC2 e PC3.

Figura 37 – Gráfico de análise de metais que reteve os três primeiros componentes principais como mais significativos para explicar os dados (coleta de agosto/2020)



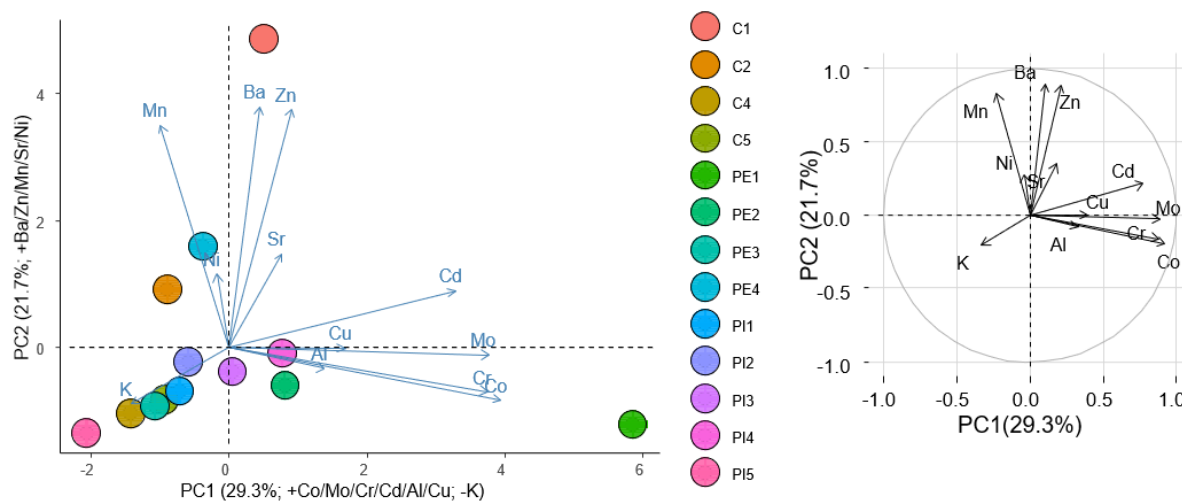
Fonte: Autoria própria

Figura 38 – Contribuições das variáveis (%) para (A) PC1, (B) PC2 e (C) PC3. As variáveis analisadas foram bário, estrôncio, manganês, potássio, molibdênio, cobre, zinco, níquel, cádmio, cromo e alumínio (coleta de agosto/2020)



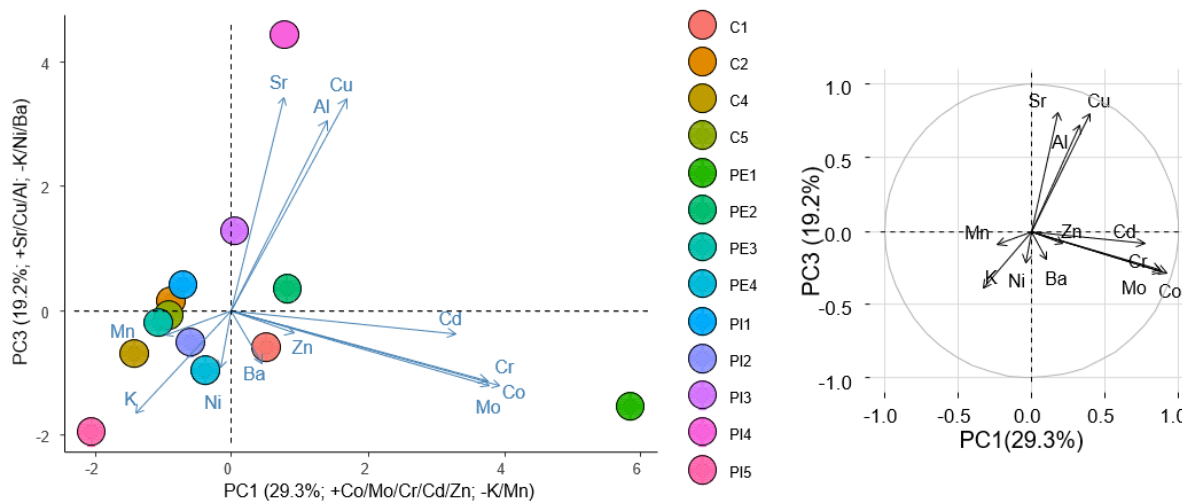
Fonte: Autoria própria

Figura 39 – Diagrama da PCA para os metais quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC2 (coleta de agosto/2020)



Fonte: Autoria própria

Figura 40 – Diagrama da PCA para os metais quantificados nas amostras dos mesocosmos, considerando PC1 e PC3 (coleta de agosto/2020)



Fonte: Autoria própria

Analisando-se os *plots* individualmente, os maiores valores para molibdênio, cromo, cobalto e cádmio estão relacionados ao PE1. Além disso, observa-se que três mesocosmos do tratamento C (C2, C4 e C5) mostram-se relacionados ao potássio, provavelmente devido ao enriquecimento desse metal causado pela aplicação da vinhaça no solo e no interior das unidades experimentais.

Nos dois diagramas da PCA observa-se que o alumínio esteve mais relacionado com os tratamentos de pastagem, principalmente o PI4. No estudo de Correa e Reichardt (1995), os

autores avaliaram o efeito do tempo de uso de pastagens sobre as propriedades de um latossolo, constatando que ao decorrer do tempo de pastejo ocorre uma redução nos teores de bases trocáveis no solo, levando ao aumento dos teores de alumínio. Observou-se que a concentração de alumínio nas amostras de água dos mesocosmos aumentaram de uma coleta para a outra, em todos os tratamentos, sendo o maior valor quantificado de 0,913 mg/L (C4) em janeiro/2020, enquanto em agosto/2020 foi de 1,896 mg/L (PI4). Portanto, as maiores concentrações do alumínio nas amostras dos tratamentos PE e PI podem ser consequência da pastagem do gado que ocorreu nessas áreas, causando um aumento desse metal no solo que foi posteriormente carregado para o interior dos mesocosmos, além da contribuição do próprio solo do cerrado que é rico em alumínio. Também deve-se levar em conta a estiagem nessa época do ano, que causou uma diminuição no nível d'água dos mesocosmos e, conseqüentemente, maior concentração dos poluentes. Conforme visto na Figura 38, os metais estrôncio (Sr), cobre (Cu) e alumínio (Al) são melhor representados pela PC3. Analisando-se o diagrama da PC1 com a PC3 (Figura 40), observa-se que o mesocosmo relacionado a esses três metais é o PI4.

5.3.5 Índice do Estado Trófico (IET)

Na Tabela 24 consta a classificação do estado trófico dos mesocosmos, determinados a partir das concentrações de clorofila *a* e fósforo total. Observa-se que o único mesocosmo que não se encontra eutrofizado é o PE1. Em comparação à classificação de janeiro/2020 (Tabela 18), com exceção do PE1 e PE2, todos os demais apresentaram piora no grau de eutrofização.

Em comparação com a primeira coleta, em agosto houve tanto redução (PE2, PI1 e C1) quanto aumento (PE1, PE3, PE4, PI2, PI3, PI4, PI5, C2, C4 e C5) nas concentrações de PT nas amostras. O maior número de amostras que tiveram aumento na concentração pode ter sido influenciado pela estiagem do inverno, uma vez que o menor volume de precipitação implica no aumento da concentração de nutrientes nos mesocosmos (PAERL; HUISMAN, 2008). Já em relação à clorofila *a*, todas as amostras apresentaram aumento significativo na concentração (exceto o PE2), com o maior aumento observado no PE4 (44 vezes maior que em janeiro/2020). Portanto, a evolução nos estágios de eutrofização observados provavelmente ocorreu devido ao aumento na proliferação de algas nos mesocosmos, decorrentes da decomposição das macrófitas.

Tabela 24 – Classificação do estado trófico dos mesocosmos (coleta de agosto/2020)

Tratamento	Clorofila a (µg/L)	Fósforo total (µg/L)	IET (Reservatórios)	Classificação
PE1	7,7	77,3	58,8	Mesotrófico
PE2	8,5	143,9	60,9	Eutrófico
PE3	75,8	272,6	68,2	Hipereutrófico
PE4	38,2	155,3	64,	Supereutrófico
PI1	31,0	163,7	64,5	Supereutrófico
PI2	40,0	169,6	65,2	Supereutrófico
PI3	29,1	250,9	65,6	Supereutrófico
PI4	21,9	310,2	65,6	Supereutrófico
PI5	23,2	314,3	65,7	Supereutrófico
C1	33,6	332,2	66,8	Supereutrófico
C2	57,6	253,6	67,3	Hipereutrófico
C4	27,1	117,8	63,1	Supereutrófico
C5	24,3	128,4	63,1	Supereutrófico

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; IET – Índice do Estado Trófico.

Fonte: Autoria própria

5.4 TESTES DE TOXICIDADE

A seguir estão descritos os resultados dos testes de toxicidade com *C. silvestrii* e os testes de germinação com *E. sativa*, ambos realizados com amostras de água coletadas nos mesocosmos (janeiro/2020 e agosto/2020) e amostras de água do escoamento superficial de cada tratamento de solo da área experimental.

5.4.1 Testes de toxicidade com *Ceriodaphnia silvestrii*

A Tabela 25 sintetiza os resultados dos testes de toxicidade aguda realizado com a espécie *C. silvestrii*, no qual o *endpoint* observado foi a imobilidade/mortalidade dos organismos. Conforme observado, na coleta de janeiro/2020 o único tratamento de solo que causou efeito foi o pasto extensivo, sendo a amostra do mesocosmo PE2 a mais crítica (85% de mortalidade), apresentando diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). Já na coleta de agosto/2020, houve 100% de mortalidade dos organismos expostos à amostra do PE1 ($p < 0,05$). Apesar dos efeitos, para ambas as coletas não foi observada diferença estatística entre a média dos tratamentos e o controle ($p > 0,05$) quanto ao número de organismos imóveis/mortos.

Tabela 25 – Resultado dos testes de toxicidade aguda para a espécie *C. silvestrii*

Amostra	Organismos imóveis/mortos	
	Coleta de janeiro/2020	Coleta de agosto/2020
Controle	0%	0%
PE1	10%	100%*
PE2	85%*	0%
PE3	5%	0%
PE4	0%	3%
$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	25±40%	26±50%
PI1	0%	0%
PI2	0%	0%
PI3	0%	0%
PI4	0%	0%
PI5	0%	0%
$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	0±0%	0±0%
C1	0%	8%*
C2	0%	5%*
C4	0%	0%
C5	0%	0%
$\bar{X}_C \pm \sigma$	0±0%	3±3%

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; \bar{X} – média; σ – desvio padrão; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

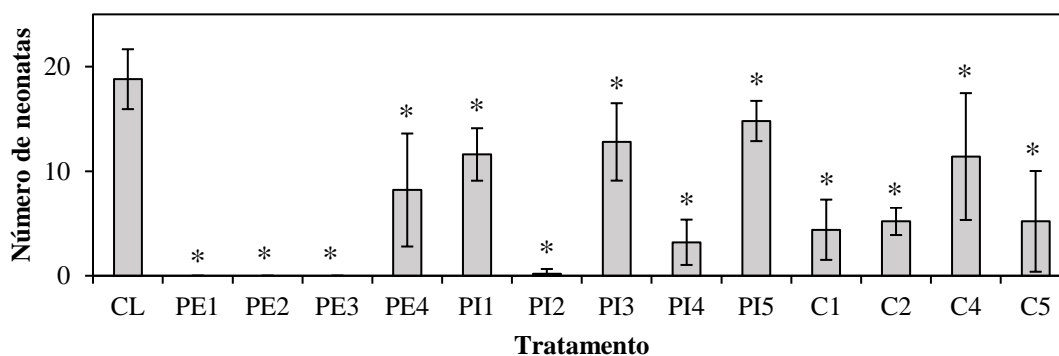
Fonte: Autoria própria

A mortalidade no tratamento PE pode estar relacionada com a concentração alta de cromo nas amostras. Observa-se que em agosto a concentração de Cr na amostra do PE1 (0,022 mg/L) foi aproximadamente dez vezes maior que nas demais amostras, e este mesocosmo foi o que apresentou mortalidade de 100% dos organismos. Porém, este metal se manteve abaixo do limite de quantificação na coleta de janeiro, não podendo se relacionar à mortalidade de 85% encontrada no PE2, o que pode ser atribuído à complexidade do sistema e outros fatores não determinados no presente estudo.

A Figura 41 ilustra os resultados do teste de toxicidade crônica, registrando-se o número total de neonatas ao fim do teste, nas amostras de cada mesocosmo. Na Figura 42 estão apresentados os resultados da média de número de neonatas considerando cada tratamento, e observa-se que há diferença estatística entre o controle e as amostras de todos os

mesocosmos ($p < 0,05$). A amostra que mais causou efeitos sobre a reprodução dos organismos foi a do pasto extensivo, registrando-se neonatas apenas na do PE4.

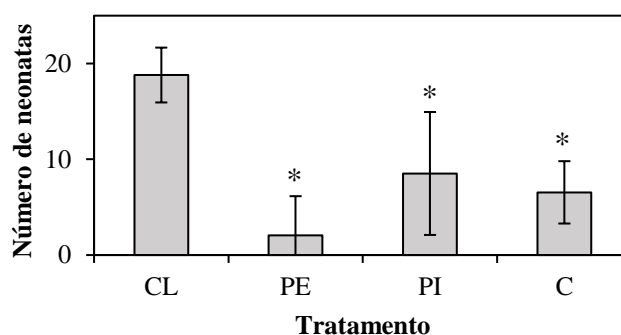
Figura 41 – Resultados do teste de toxicidade crônica para a espécie *C. silvestrii* em amostras de água de cada mesocosmo (coleta de janeiro/2020).



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Figura 42 – Resultados do teste de toxicidade crônica para a espécie *C. silvestrii* como média do número de neonatas em cada tratamento de solo (coleta de janeiro/2020)

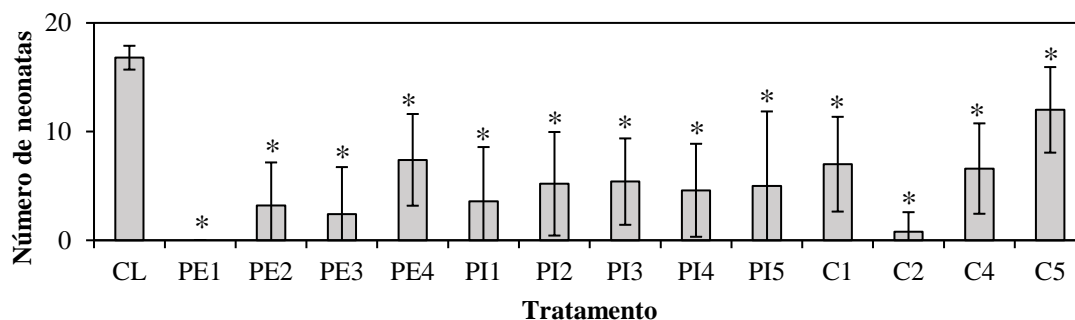


Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

A Figura 43 e a Figura 44 ilustram os resultados do teste de toxicidade crônica para as amostras coletadas em agosto/2020. Observa-se que, tal como o ensaio realizado com as amostras de janeiro, há diferença estatística entre o controle e os tratamentos ($p < 0,05$) e o tratamento PE apresentou o menor número de neonatas.

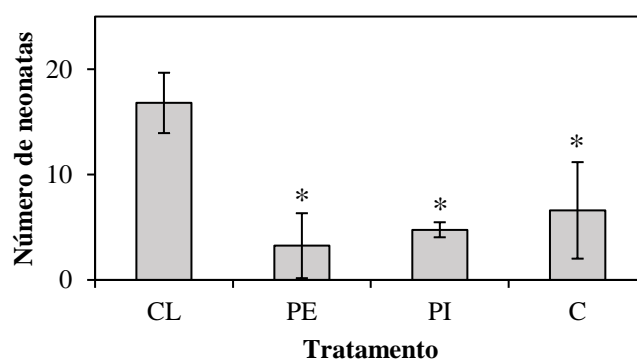
Figura 43 – Resultados do teste de toxicidade crônica para a espécie *C. silvestrii* em amostras de água de cada mesocosmo (coleta de agosto/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Figura 44 – Resultados do teste de toxicidade crônica para a espécie *C. silvestrii* como média do número de neonatas em cada tratamento (coleta de agosto/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Comparando-se com o controle, as amostras dos três tratamentos para ambas as coletas causaram efeitos sobre a reprodução dos organismos ($p < 0,05$), portanto foram afetadas pelo tipo de manejo do solo referente a cada tratamento. A maior inibição de reprodução no tratamento PE pode ser consequência da menor concentração de nutrientes na água, presença de metais e/ou proximidade com outras áreas de agricultura. Observou-se que para as amostras do PE de ambas as coletas as concentrações de NT, PT, Pi e PDT se mostraram, na média, abaixo das quantificadas para os tratamentos PI e C (Tabela 14 e Tabela 22). É esperado que concentrações mais elevadas de nutrientes (nitrogênio e fósforo) estimulem a maior reprodução dos organismos-teste (MOREIRA et al., 2018), assim, pode-se

relacionar a maior presença de nutrientes nos tratamentos PI e C com os maiores números de neonatas registradas no teste de toxicidade, para tais tratamentos de solo. Por exemplo, dentre os mesocosmos dos *plots* do PI, observa-se que o PI2 apresentou as menores concentrações dos nutrientes acima citados (Tabela 14, janeiro/2020), e também foi o que apresentou maior efeito sobre a reprodução (Figura 41) no grupo da pastagem intensiva.

Apesar da maior reprodução nos tratamentos PI e C e das maiores concentrações de nutrientes quantificadas nestes tratamentos, ainda são observados efeitos no número de neonatas em comparação com o controle de laboratório, provavelmente causada pela mistura de contaminantes presentes nestes tratamentos. Silva et al. (2020) avaliaram a toxicidade aguda e crônica de formulações 2,4-D e fipronil utilizando o organismo teste *C. silvestrii*. Os autores constataram que a exposição ao 2,4-D (individualmente) causou imobilidade nos organismos a concentrações acima de 100 mg/L, enquanto a taxa de reprodução diminuiu em concentrações acima de 60 mg/L. Já o fipronil causou imobilidade a 2 µg/L e queda na taxa de reprodução a 0,8 µg/L. O valor máximo quantificado de 2,4-D nas amostras do presente estudo foi de 7,4 µg/L (C5, janeiro/2020), e 0,027 µg/L para o fipronil (C2, janeiro/2020), portanto abaixo das concentrações avaliadas por Silva et al. (2020). Com essas duas maiores concentrações não foi observado efeito agudo na *C. silvestrii* (Tabela 25). Além disso, é importante ressaltar que os testes de Silva et al. (2020) foram realizadas com água de cultivo, enquanto no presente estudo as amostras provêm de uma matriz ambiental com uma mistura complexa de substâncias, incluindo aquelas que não foram quantificadas.

Silva et al. (2020) também avaliaram o efeito agudo da mistura de 2,4-D e fipronil sobre a *C. silvestrii* e constataram que a interação de concentrações demonstra antagonismo em baixas doses e sinergismo em altas doses, já para a toxicidade crônica de mistura (reprodução), ocorreu antagonismo como resultado da interação dos agrotóxicos, com valores de EC₅₀ de 72,88 mg/L para o 2,4-D e 0,015 mg/L para o fipronil. Conforme visto, a maior concentração de 2,4-D (7,4 µg/L, C5, janeiro/2020) e fipronil (0,027 µg/L, C2, janeiro/2020) quantificadas no presente estudo estão abaixo da concentração efetiva encontrada pelos autores acima. Para a coleta de agosto/2020 também se observa que a reprodução foi afetada nos três tratamentos, e apesar de em menor quantidade em relação à coleta anterior, a maior concentração de fipronil foi quantificada no *plot* C2 (2 ng/L), o qual apresentou o menor número de neonatas dentre os demais do tratamento da cana-de-açúcar.

Em outro estudo, Freitas et al. (2021) simularam o *input* do 2,4-D sob condições controladas em um trecho de 500 m de comprimento de um riacho tropical, realizando testes ecotoxicológicos com *C. silvestrii* a partir de 2 coletas de amostras (período chuvoso e seco) em 8 pontos ao longo do riacho, com concentrações do herbicida variando de 0,0057 a 16 µg/L. Não foi observado efeito agudo nos organismos, porém foi constatada a inibição de reprodução na espécie, com cerca de 50% da reprodução inibida em todos os pontos de amostragem na primeira coleta. Como a coleta foi realizada em um riacho, os autores atestam que o efeito pode ter sido influenciado por outros poluentes (co-contaminação) e condições ambientais do corpo d'água, uma vez que sob condições de campo os fatores ambientais podem alterar a toxicidade do 2,4-D. Como observado no presente estudo, os maiores efeitos sobre os organismos (agudos e crônicos) ocorreram com os testes das amostras do tratamento PE, as quais apresentaram as menores quantificações de 2,4-D e fipronil. Portanto, provavelmente foi influência das condições de campo (como a falta de nutrientes) e outros fatores ambientais dos mesocosmos e suas áreas de entorno. Além disso, também deve-se considerar a concentração de metais, que pode ser agravada pelos valores de pH que aumentam a disponibilidade.

Moreira et al. (2020) também realizaram testes de toxicidade crônica com *C. silvestrii* em concentrações de grande relevância ambiental, ou seja, quantificadas em águas superficiais (5 µg/L de fipronil e 500 µg/L de 2,4-D, isolados e em mistura com cairomônios de peixe). Os autores constataram que os organismos não apresentaram respostas prejudiciais quando exposto a 2,4-D isolado ou à sua mistura simples com água condicionada com cairomônios. No entanto, a sobrevivência média das espécies diminuiu no tratamento de cairomônios misturados com fipronil e no tratamento com uma mistura de fipronil, 2,4-D e cairomônios. A taxa de aumento populacional também diminuiu significativamente para organismos expostos para o tratamento com fipronil e para misturas dos três compostos analisados. Conforme observada na quantificação de agrotóxicos no presente estudo, pode-se considerar que os organismos testados foram expostos à mistura de 2,4-D com fipronil, sendo esperado maior efeito quanto maiores as concentrações, que foram nos mesocosmos dos *plots* C2 e C4, na coleta de janeiro/2020. Nesses tratamentos não foi observado efeito agudo, porém a amostra do C2 apresentou o segundo menor número de neonatas no teste de toxicidade crônica, enquanto no C4 também foi observado efeito, pois o mesmo se manteve abaixo do controle.

A Tabela 26 é referente ao teste de toxicidade aguda utilizando a mesma espécie (*Ceriodaphnia silvestrii*), porém com as amostras de água do escoamento superficial dos três tipos de tratamento de solo. Observa-se que as amostras não causaram efeito de toxicidade aguda sobre os organismos, além de não haver diferença estatística entre o controle e os tratamentos ($p > 0,05$).

Tabela 26 – Resultado do teste de toxicidade aguda para a espécie *C. silvestrii* para as amostras de escoamento superficial (coleta em janeiro/2020)

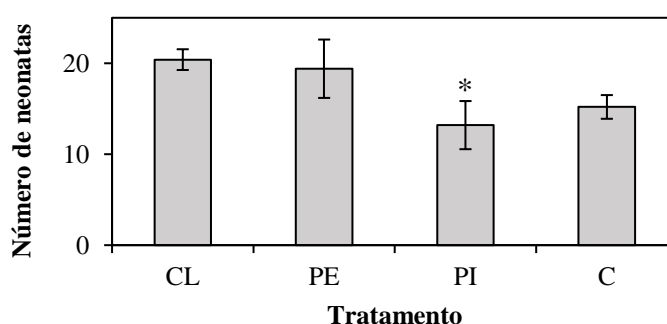
Amostra	Organismos imóveis/mortos
Controle	0%
PE	0%
PI	0%
C	0%

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria

Na Figura 45 são apresentados os resultados dos testes de toxicidade crônica, utilizando amostras de água do escoamento superficial. Observa-se que, ao contrário do teste com as amostras de água do mesocosmo, no tratamento PE obteve-se o maior número médio de neonatas. Além disso, foi observada diferença estatística entre o controle e o tratamento PI ($p < 0,05$).

Figura 45 – Resultados do teste de toxicidade crônica para a espécie *C. silvestrii* para as amostras de escoamento superficial (coleta em janeiro/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Comparando-se as variáveis físico-químicas das amostras de água dos mesocosmos e do escoamento superficial, observou-se que a concentração de metais (principalmente alumínio e zinco) no escoamento foi significativamente maior para os três tratamentos (vide Tabela 17). Entre eles, as maiores concentrações foram quantificadas no tratamento PI, com alumínio (44 mg/L), cobre (0,031 mg/L) e zinco (0,87 mg/L) excedendo o limite estabelecido pela legislação. Em águas doces brasileiras, as concentrações de zinco são encontradas na faixa de 0,002 a 1,125 mg/L (FRIESE et al., 2010; RODGHER et al., 2005), enquanto o alumínio é quantificado entre 0,028 e 3,8 mg/L (PEREIRA et al., 2018; STEFFENS et al., 2015), sendo a última bem menor do que a concentração encontrada na amostra do escoamento superficial do presente estudo.

Quanto à toxicidade dos metais sobre os organismos, o alumínio é neurotóxico e pode causar distúrbios respiratórios causados pelo acúmulo do metal ou pela desregulação iônica, enquanto o zinco, apesar de ser um metal essencial, pode estar associado à disfunção na captação de cálcio nas brânquias dos cladóceros (GENSEMER et al., 2018; HYNE et al., 2005; ZATTA; LAIN; CAGNOLINI, 2000). Gebara et al. (2021) avaliaram os efeitos do zinco e do alumínio sobre a *C. silvestrii*, obtendo EC_{50} 7 dias de 0,11 mg/L (zinco) e 0,37 mg/L (alumínio). A partir dos ensaios crônicos, os autores constataram que ambos os metais afetaram a fecundidade dos organismos, sendo que o zinco inibiu a produção de neonatas em concentrações mais baixas do que o alumínio. Quanto à concentração letal (CL_{50}) desses metais sobre os dafnídeos, alguns valores encontrados na literatura são de 0,08 mg Zn/L (*C. reticulata*) (NORBERG, 1984), 0,13 mg Zn/L (*D. pulex*) (GOSTOMSKI, 1990), 0,13 mg Zn/L e 1,9 mg Al/L (*C. dubia*) (MOUNT; NELSON; ROLINE, 1998) e 1,54 mg Al/L (*C. cornuta*) (PÉREZ-LEGASPI et al., 2017). A partir dessas concentrações, o efeito agudo era esperado para os organismos do presente estudo, uma vez que os metais quantificados no escoamento superficial excedem as concentrações letais da literatura. Porém, foi quantificada a concentração total de metais (particulado e dissolvido), os quais poderiam não estar biodisponíveis para os organismos por diversos fatores, e também deve-se considerar que a toxicidade dos metais pode ser alterada em conjunto com as outras substâncias da amostra ambiental. Por fim, o efeito crônico observado também pode estar correlacionado com a presença de zinco e alumínio nas amostras, principalmente para o tratamento de pasto intensivo.

5.4.2 Testes de toxicidade com *Eruca sativa*

A Tabela 27 resume o resultado do teste de germinação das sementes de rúcula (*Eruca sativa*). Não foi observada diferença estatística entre o controle e os tratamentos para ambas as coletas ($p > 0,05$). No entanto, tal como nos testes de toxicidade com *C. silvestrii*, na coleta de janeiro/2020, a amostra do tratamento PI causou maior efeito, apresentando o menor valor de germinação média das sementes (84%) e menor porcentagem no PI2 (57%). A maior porcentagem obtida pelo tratamento da cana-de-açúcar pode ser explicada pela aplicação da vinhaça nos mesocosmos dos plots C4 e C5, em novembro de 2019. Responsável pela fertilização do solo e altas concentrações de nitrogênio e fósforo em sua composição, a vinhaça de cana-de-açúcar pode ter influenciado na maior germinação das sementes irrigadas com a amostra. Já na coleta de agosto, o maior efeito sobre a germinação média ocorreu no tratamento C (84%), com menor porcentagem obtida para o plot C2 (73%).

Tabela 27 – Resultado dos testes de germinação para a espécie *E. sativa*

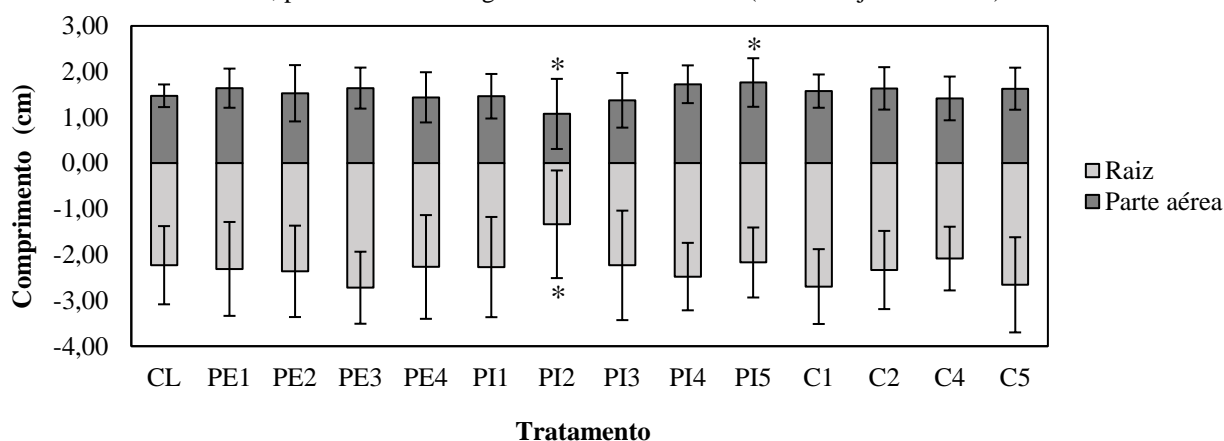
Amostra	Germinação média	
	Coleta de janeiro/2020	Coleta de agosto/2020
Controle	100%	100%
PE1	93%	90%
PE2	83%	93%
PE3	90%	97%
PE4	93%	93%
$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	90 \pm 4%	93 \pm 2%
PI1	90%	100%
PI2	57%*	97%
PI3	90%	80%
PI4	93%	87%
PI5	90%	87%
$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	84 \pm 14%	90 \pm 7%
C1	93%	77%
C2	87%	73%
C4	87%	93%
C5	97%	93%
$\bar{X}_C \pm \sigma$	91 \pm 4%	84 \pm 9%

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; \bar{X} – média; σ – desvio padrão; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Na Figura 46 estão apresentados os comprimentos médios da parte aérea e da raiz para as amostras de cada mesocosmo, enquanto a Figura 47 apresenta a média para cada tratamento. O mesocosmo PI2 se mostrou diferente estatisticamente do controle ($p < 0,05$) para os dois *endpoints*, enquanto o PI5 apresentou diferença estatística apenas para o comprimento da parte aérea, que foi maior que o do grupo controle.

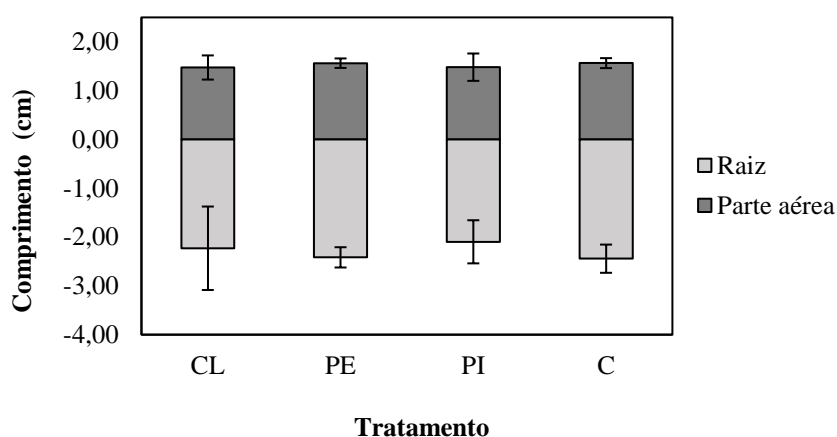
Figura 46 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio da raiz e da parte aérea da espécie *E. sativa*, para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de janeiro/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Figura 47 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio da raiz e da parte aérea da espécie *E. sativa*, como média de cada tratamento (coleta de janeiro/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria

Observa-se que a amostra do tratamento PI2 foi a que causou o maior efeito sobre a média de crescimento das rúculas, tanto na parte aérea quanto na raiz, além de possuir a

menor porcentagem de germinação (57%) dentre todos os tratamentos. Dentre as 5 amostras do pasto intensivo, a quantificação de nutrientes no mesocosmo PI2 (Tabela 14) apresentou as menores concentrações de nitrogênio total (930 µg/L), nitrito (2,49 µg/L), fósforo total (105 µg/L), fosfato inorgânico (14 µg/L), fósforo total dissolvido (29 µg/L) e silicato (790 µg/L), o que provavelmente justifica o efeito sobre a *E. sativa*, que assim como a alface (*L. sativa*), em condições ideais requer solos ricos em matéria orgânica e nutrientes para seu desenvolvimento (FERREIRA, 2007). Além disso, os tratamentos PE3 e C1 apresentaram os maiores valores de crescimento médio da raiz. Em ambos foram quantificadas as maiores concentrações de nitrogênio total e fósforo total (entre as amostras do mesmo tratamento de solo), os quais se configuram como nutrientes essenciais para o crescimento de plantas dicotiledôneas, gerando incrementos da biomassa conforme se aumenta a disponibilidade de nutrientes às plantas (ARAÚJO, 2003). Koetz et al (2012) demonstraram que doses de fósforo aplicadas no cultivo da rúcula influenciam positivamente a massa seca da parte aérea e de raiz, demonstrando um efeito linear crescente sobre estas variáveis.

Além disso, as plantas irrigadas com amostras do tratamento da cana-de-açúcar apresentaram maior comprimento médio de raiz. A vinhaça possui alta concentração de matéria orgânica, a qual é responsável pela disponibilização de nutrientes quando mineralizada, conseqüentemente favorecendo o desenvolvimento radicular das plantas dicotiledôneas (KOMINKO; GORAZDA; WZOREK, 2022; OLAYEMI; KALLENBACH; WALLENSTEIN, 2022). Além disso, a vinhaça bruta utilizada no presente estudo possui altas concentrações de nitrogênio (1,4 g/L) e potássio (8,5 g/L), que contribuem para o maior crescimento de mudas de rúcula (ENSINAS et al., 2014). Portanto, o fato dos *plots* C4 e C5 terem sido fertirrigados com vinhaça (tanto no solo quanto no interior dos mesocosmos) pode ter influenciado no maior desenvolvimento das raízes da *E. sativa*. No entanto, é fundamental estabelecer uma dose adequada para aplicação de vinhaça agrotóxicos cultivos agrícolas, uma vez que podem trazer danos aos solos e plantas se não houver o devido controle (FONTANETTI; BUENO, 2017).

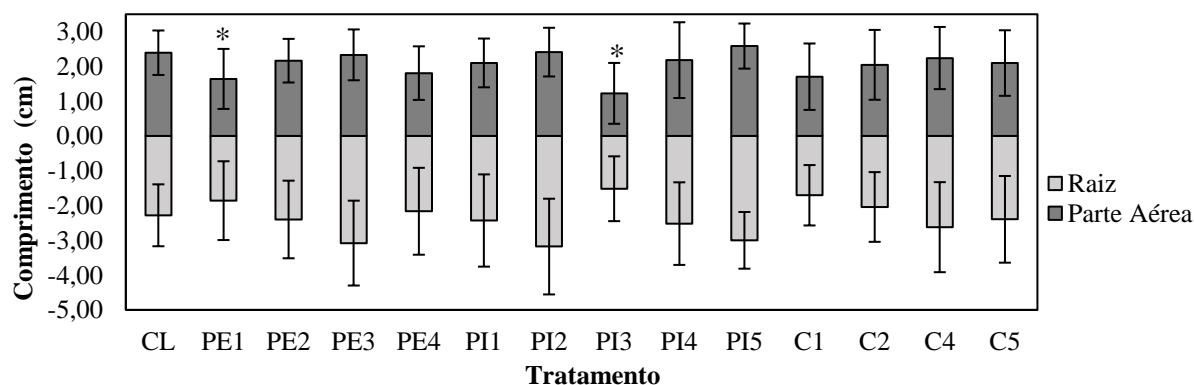
Ogura et al. (2022b) avaliaram a fitotoxicidade da *E. sativa* através de bioensaios com água de mesocosmos contaminados com o herbicida 2,4-D, o inseticida fipronil e a vinhaça de cana-de-açúcar, individualmente e em mistura. Entre os contaminantes, a *E. sativa* mostrou-se mais sensível ao 2,4-D nos testes de germinação, sendo que no tratamento apenas com o herbicida (303,6 a 1384,8 µg/L), foi constatada uma completa inibição no crescimento da raiz

e da parte aérea das plantas, porém não foi observada fitotoxicidade associada ao fipronil. Isso porque o 2,4-D é um herbicida e tem seu modo de ação associado diretamente com as plantas dicotiledôneas, agindo como um hormônio de crescimento vegetal que resulta no crescimento descontrolado da planta, causando enrolamento do caule, murchamento das folhas e eventual morte (GOULART et al., 2020; SONG, 2014). Já o fipronil tem modo de ação direcionado para os insetos, agindo na interrupção da função normal do sistema nervoso central, causando a hiperexcitação de nervos e músculos dos organismos (LI et al., 2019; OZOE et al., 2015). Portanto, é de esperar que a fitotoxicidade seja mais relacionada ao 2,4-D ao invés do fipronil.

Já Freitas et al. (2022) realizaram testes de toxicidade com *E. sativa* a partir de amostras coletadas de um riacho experimentalmente contaminado com 2,4-D, com concentrações de 0,0057 a 16 µg/L quantificadas nas amostras. Os autores constataram que com a exposição às amostras de água após a contaminação, a planta apresentou um menor comprimento médio da raiz. No presente estudo, a maior concentração de 2,4-D quantificada foi de 7,4 µg/L (C4, janeiro/2020), que está dentro da faixa testada pelos autores acima e, entre os *plots* da cana do presente estudo, o mesocosmo C4 apresentou o menor crescimento da raiz e parte aérea, podendo ter sido influenciado pela ação do herbicida.

A Figura 48 ilustra os resultados do teste de toxicidade com *E. sativa* para as amostras de água coletadas em agosto/2020, enquanto Figura 49 apresenta a média para cada tratamento. Foi observada diferença estatística entre o controle e os mesocosmos PE1 e PI3 quanto ao comprimento da parte aérea ($p < 0,05$).

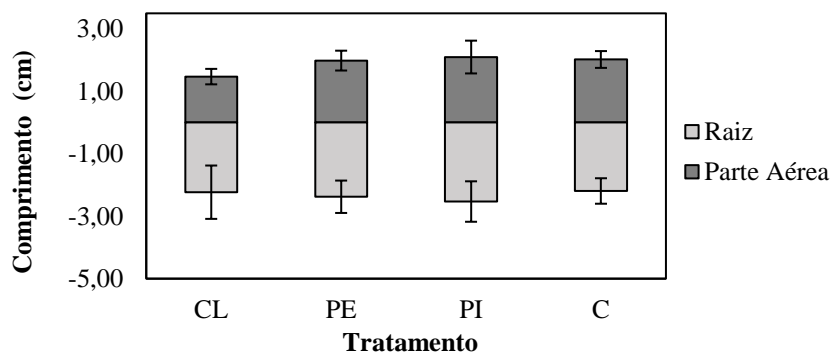
Figura 48 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio da raiz e da parte aérea da espécie *E. sativa*, para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de agosto/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Figura 49 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio da raiz e da parte aérea da espécie *E. sativa*, como média de cada tratamento (coleta de agosto/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria

Observa-se que não há diferença significativa entre os três tratamentos ($p > 0,05$), e os mesmos apresentaram comprimentos, tanto da raiz quanto da parte aérea, maiores que o controle. Conforme visto anteriormente, a concentração de agrotóxicos nas amostras foi reduzida ao longo dos meses de janeiro e agosto/2020, portanto provavelmente reduziu-se o efeito estressor sobre a planta, principalmente relacionado ao 2,4-D, favorecendo o maior desenvolvimento da *E. sativa* com a exposição às amostras coletadas em agosto/2020.

Na Tabela 28 consta o resultado do teste de germinação para as amostras do escoamento superficial. Nota-se que a porcentagem de germinação de sementes de *E. sativa* seguiu o padrão das amostras de água dos mesocosmos, sendo PE o tratamento com a menor média, e C, com a maior. Não foi observada diferença estatística entre o controle e os tratamentos ($p > 0,05$).

Tabela 28 – Resultado do teste de germinação para a espécie *E. sativa* para as amostras de escoamento superficial (coleta de agosto/2020)

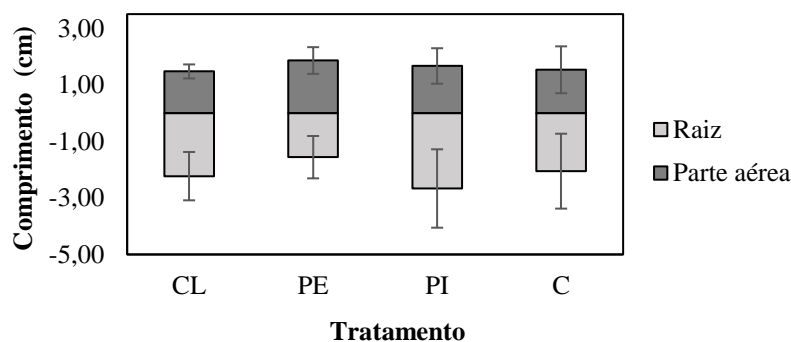
Tratamento	Germinação média
Controle	100%
PE	73%
PI	83%
C	93%

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria

A Figura 50 ilustra os resultados dos testes de germinação em termos de comprimento da parte aérea e da raiz, utilizando amostras do escoamento superficial de cada tratamento de solo. Tanto para o comprimento da parte aérea quanto da raiz não foi observada diferença estatística entre o controle e os tratamentos ($p > 0,05$).

Figura 50 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio da raiz e da parte aérea da espécie *E. sativa*, para amostras de escoamento superficial



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria

As hortaliças folhosas (tal como a rúcula) são consideradas exigentes em nutrientes, em função de seu ciclo curto, sendo o nitrogênio o nutriente mineral relevante para o aumento do crescimento da parte aérea da planta (GRANGEIRO et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2019). Apesar de não haver diferença estatística, observando-se o crescimento da parte aérea da planta, em que $PE > PI > C$, todos apresentaram comprimento médio da parte aérea maior do que o grupo controle. Na quantificação de nutrientes nas amostras do escoamento superficial, o PE apresentou a maior concentração de nitrogênio total ($5180 \mu\text{g/L}$), seguida pelo PI ($5130 \mu\text{g/L}$) e C ($5090 \mu\text{g/L}$), portanto as concentrações são praticamente similares e podem ter influenciado no resultado do teste com a rúcula, influenciando no maior desenvolvimento da parte aérea em relação ao controle. Além disso, associa-se a ação benéfica do silício a diversos efeitos indiretos nas plantas, tais como: aumento na capacidade fotossintética, plantas mais eretas, redução da transpiração, aumento da resistência mecânica das células, maior resistência às doenças e insetos, diminuição do efeito tóxico do Mn, Fe e outros metais pesados e aumento da absorção e metabolismo de elementos, tal como o fósforo (GUERRERO; BORGES; FERNANDES, 2008). Conforme visto na Tabela 15, o silicato foi quantificado nas amostras em $710 \mu\text{g/L}$ (PE), $1540 \mu\text{g/L}$ (PI) e $1150 \mu\text{g/L}$ (C), portanto o

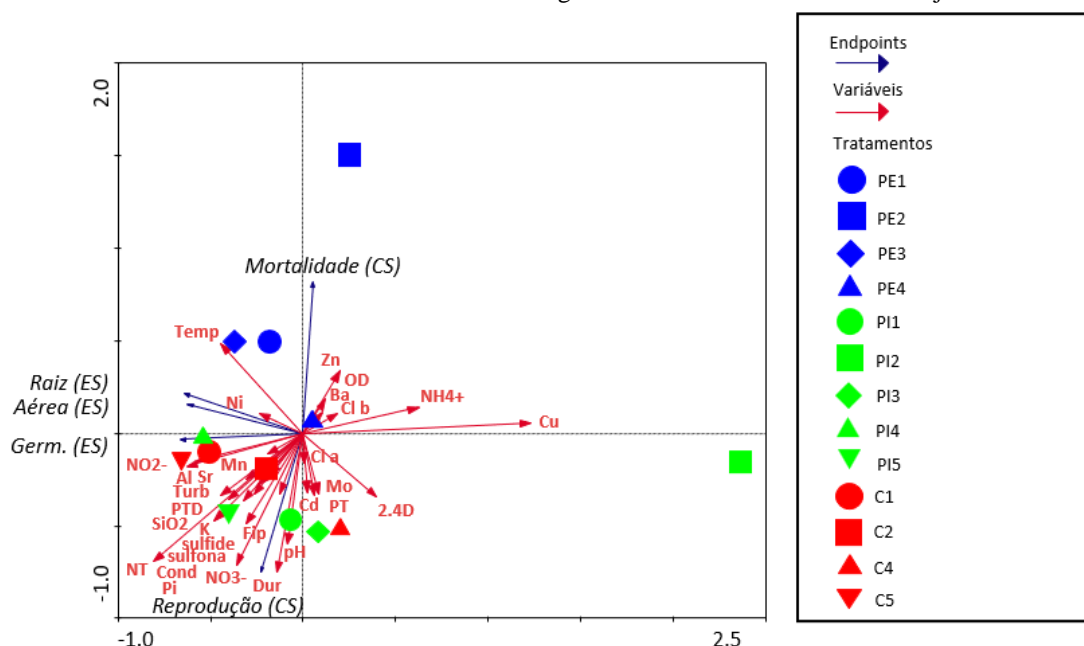
comprimento médio da raiz que segue a ordem PI > C > PE também pode ter sido influenciada pela ação desse nutriente sobre o desenvolvimento da planta.

O maior efeito sobre crescimento da raiz observado no tratamento PE também pode ter ocorrido em virtude da menor quantidade de nutrientes essenciais para o desenvolvimento da raiz das plantas. Entre eles, o fósforo é um macronutriente importante, pois além da função de armazenamento de energia é componente dos lipídeos e acelera a formação de raízes (ROSA et al., 2021). No estudo de Magalhães et al. (2019), o aumento da disponibilidade de fósforo causou ganhos médios consideráveis no comprimento das raízes de *E. sativa*. Nas amostras do escoamento superficial, o PE apresentou a menor concentração de fósforo total (833 µg/L) em relação ao PI (1971 µg/L) e C (1369 µg/L), o que pode explicar a menor média de comprimentos da raiz obtida com a amostra do pasto extensivo.

5.4.3 Análise de Redundância (RDA)

Neste tópico são apresentados os diagramas das Análises de Redundância. A Figura 51 apresenta a RDA relacionando os *endpoints* observados nos testes de toxicidade e as variáveis físicas, químicas e biológicas medidas *in loco* e em laboratório, referentes às amostras coletadas em janeiro/2020. Foram representados os seguintes *endpoints*: mortalidade e reprodução de *C. silvestrii*; e germinação, comprimento da raiz e comprimento da parte aérea de *E. sativa*. Os eixos 1 e 2 do gráfico explicam 54,4 e 29,4% da variância dos dados, totalizando 83,8%.

Figura 51 – Diagrama da RDA para as variáveis físicas, químicas e biológicas e testes de toxicidade com *C. silvestrii* e *E. sativa* referentes às amostras de água coletadas nos mesocosmos em janeiro/2020



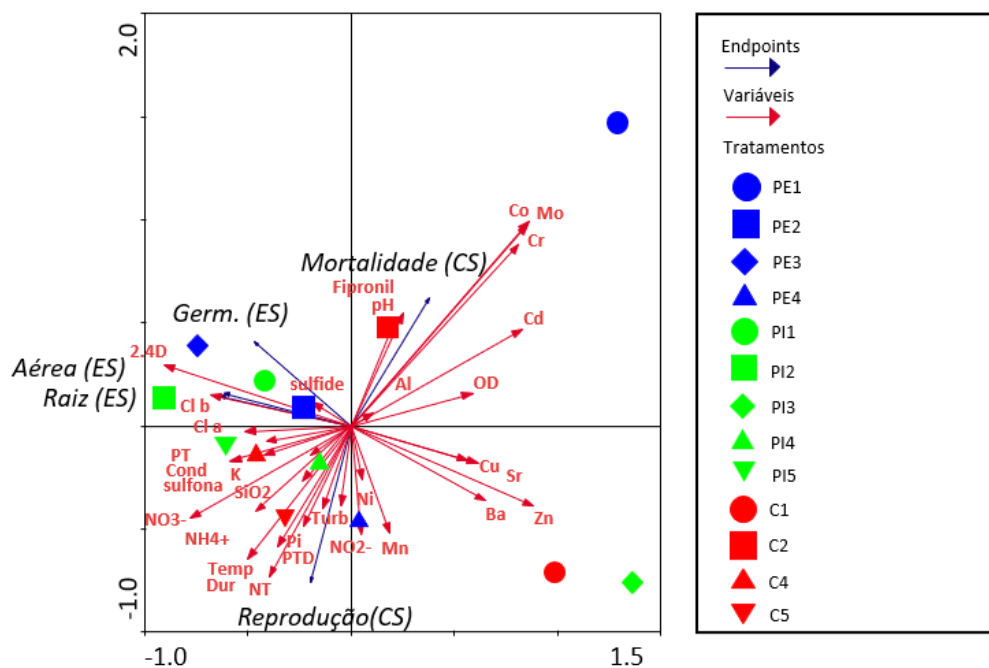
Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; ES – *Eruca sativa*; CS – *Ceriodaphnia silvestrii*.

Fonte: Autoria própria

Observa-se um padrão para os tratamentos da cana-de-açúcar e pasto intensivo: os *plots* se encontram majoritariamente no terceiro quadrante e próximos entre si, exceto o mesocosmo do *plot* PI2 que se distanciou dos demais. Esse comportamento era esperado, uma vez que as áreas do C e PI receberam aplicação de fertilizante e agrotóxicos. Quanto aos testes com *C. silvestrii*, na reprodução dos organismos houve influência principalmente dos nutrientes e do fipronil. A maior taxa de mortalidade se mostrou correlacionada ao tratamento PE, conforme visto anteriormente na Tabela 25, no entanto não apresentou relação com alguma variável significativa, visto que variáveis mais próximas (zinco, oxigênio dissolvido, bário e clorofila b) possuem tamanhos dos vetores menores que os demais. A germinação de sementes de *E. sativa* esteve mais relacionada ao nitrito, e com maiores valores associados aos mesocosmos PI4, C1 e C5. Sabe-se que nitrato e nitrito são capazes de estimular a germinação e quebrar a dormência das sementes de diversas espécies (BEWLEY; BLACK, 2014), podendo-se justificar o comportamento observado nessas amostras. Os comprimentos de raiz e da parte aérea apresentaram relação apenas com o níquel.

A Figura 52 apresenta a Análise de Redundância (RDA) relacionando os *endpoints* observados nos testes de toxicidade e as variáveis físicas, químicas e biológicas medidas *in loco* e em laboratório para a coleta de agosto/2020. Os eixos 1 e 2 do gráfico explicam 53 e 32% da variância dos dados, totalizando 85%.

Figura 52 – Diagrama da RDA para as variáveis físicas, químicas e biológicas e testes de toxicidade com *C. silvestrii* e *E. sativa* referentes às amostras de água coletadas nos mesocosmos em agosto/2020



Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; ES – *Eruca sativa*; CS – *Ceriodaphnia silvestrii*.

Fonte: Autoria própria

A localização dos mesocosmos neste gráfico não apresentaram um padrão entre os tratamentos do solo. Essa variação pode estar relacionada ao tempo decorrido desde as intervenções realizadas no solo, deixando a área sob influência dos residuais de agrotóxicos e componentes autóctones do solo. Os mesocosmos dos *plots* PE2, PE3, PI1 e PI2 (segundo quadrante) mostram a maior relação aos *endpoints* dos testes com a rúcula e influenciados pelo 2,4-D, fipronil sulfide e clorofila *b*. Já o PI3 e C1 se localizam no quadrante oposto, apresentando influência dos metais (manganês, bário, zinco, cobre e estrôncio) e com menor relação aos *endpoints* da *E. sativa*. Conforme visto na Figura 48, tais *plots* apresentaram os menores valores médios de comprimento das plantas. A mortalidade de *C. silvestrii* no teste agudo se mostrou relacionada principalmente ao pH, fipronil, cobalto, molibdênio e cromo. Conforme visto na análise de PCA de agosto (Figura 33), o C2 também apresentou influência

do fipronil na RDA. Para a mortalidade de *C. silvestrii*, o *plot* PE1 foi o único do pasto extensivo que apresentou relação com este *endpoint*. Quanto à reprodução dos organismos, houve influência principalmente dos nutrientes, tanto os nitrogenados quanto os fosfatados, relacionando-se principalmente com o mesocosmo C5.

5.4.4 Testes de toxicidade com *Chironomus sancticaroli*

A Tabela 29 sintetiza os resultados dos testes de toxicidade realizados com a espécie *C. sancticaroli* com as amostras de sedimento dos mesocosmos, no qual o *endpoint* observado foi a sobrevivência dos organismos, não havendo diferença estatística entre o controle e os tratamentos ($p > 0,05$) para ambas as coletas. Como média dos tratamentos, a taxa crescente de mortalidade na coleta de janeiro segue a ordem PE, PI e C, com as maiores porcentagens registradas nos *plots* C1 (20%) e C4 (17%). Na coleta de agosto, as amostras do PI causaram maior mortalidade dos organismos, com maior porcentagem no PI5 (23%).

Tabela 29 – Resultado dos testes de toxicidade para a espécie *C. sancticaroli*

Amostra	Organismos sobreviventes	
	Coleta de janeiro/2020	Coleta de agosto/2020
Controle	95%	90%
PE1	90%	93%
PE2	97%	90%
PE3	97%	97%
PE4	97%	90%
$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	95 \pm 3%	93 \pm 3%
PI1	87%	83%
PI2	93%	97%
PI3	93%	87%
PI4	90%	93%
PI5	100%	77%
$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	93 \pm 5%	87 \pm 8%
C1	80%	87%
C2	97%	87%
C4	83%	93%
C5	93%	97%
$\bar{X}_C \pm \sigma$	88 \pm 8%	93 \pm 5%

Notas: PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; \bar{X} – média; σ – desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

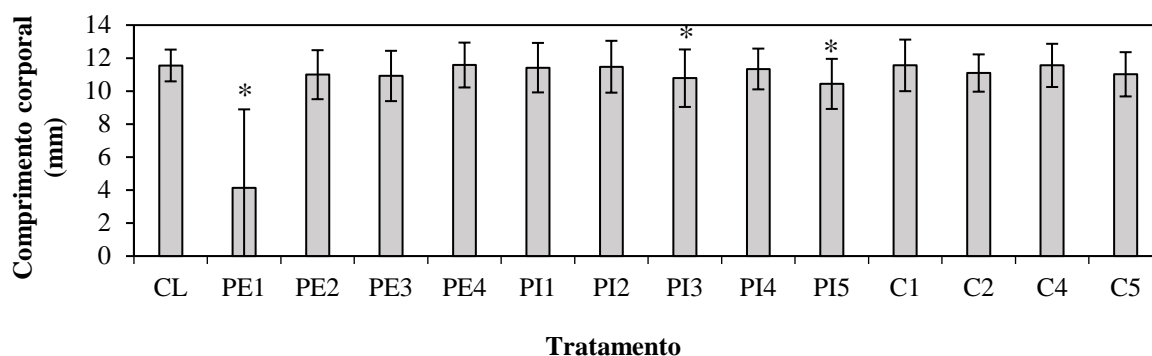
Conforme a literatura, os dípteros apresentam maior resistência ao herbicida 2,4-D do que ao inseticida fipronil, sendo que as concentrações letais para o primeiro se mantêm na unidade de mg/L (AL-SHAMI et al., 2006; FARAH et al., 2004). No estudo de Pinto et al. (2021), os autores demonstraram que o fipronil é mais tóxico ao *C. sancticaroli* do que ao 2,4-D, uma vez que para este não foi observado nenhum efeito na sobrevivência nas concentrações testadas (0,3 a 3,7 µg/L para fipronil e 29 a 426 µg/L para 2,4-D). Já para o fipronil, a sobrevivência diminuiu significativamente com as concentrações de 0,7 µg/L ($79 \pm 7\%$), 1,3 µg/L ($59 \pm 12\%$) e 3,7 µg/L ($42 \pm 10\%$). Monteiro et al. (2019) estimaram $CL_{50\ 48h}$ (concentração que causa morte em 50% da população) de 1,74 µg/L para a espécie *Chironomus riparius* exposta ao fipronil, sendo que na maior concentração testada (25,6 µg/L), todas as larvas morreram após 48 horas de exposição. Para o mesmo inseticida, Stevens, Helliwell e Warren (1998) estimaram a $CL_{50\ 24h}$ em 0,43 µg/L para *Chironomus tepperi*, Ali et al. (1998) estimaram a $CL_{50\ 48h}$ em 0,42 µg/L para *Chironomus crassicaudatus*, enquanto Chaton et al. (2002) encontraram o valor de 2,45 µg/L para *Chironomus annularius*. Quanto à quantificação dos agrotóxicos nas amostras de sedimento do presente estudo, as maiores concentrações de fipronil ocorreram nos tratamentos PI1 (39,6 pg/g), C2 (22,9 pg/g), C4 (31,9 pg/g) e C5 (48,4 pg/g), conforme visto anteriormente na Tabela 13 (janeiro/2020). A partir dos testes de toxicidade, observou-se que as maiores taxas de mortalidade ocorreram com a exposição às amostras de sedimento dos tratamentos C e PI, as quais apresentaram as maiores concentrações de fipronil.

Quanto aos subprodutos do fipronil, Weston e Lydy (2014) realizaram testes com 14 espécies de macroinvertebrados, sendo que 11 deles apresentaram valores de EC_{50} menores para os subprodutos do que para o fipronil, comprovando a maior toxicidade dos metabólitos. Para a espécie mais sensível dentre as analisadas (*Chironomus dilutus*), os valores de $EC_{50\ (96h)}$ obtidos foram de 32,5 ng/L, 9,9 ng/L e 7,7 ng/L para fipronil, fipronil sulfide e fipronil sulfona, respectivamente. Com resultado similar, Gunasekara et al. (2007) obtiveram para a espécie *Daphnia magna* valores de $EC_{50\ (21\ dias)}$ de 190, 27 e 4,5 µg/L para fipronil, fipronil sulfide e fipronil sulfona, respectivamente, evidenciando o maior efeito dos metabólitos sobre os organismos. No presente estudo, observou-se que os subprodutos do fipronil ficaram abaixo do limite de quantificação nas amostras de sedimento coletadas em janeiro/2020 (Tabela 13). Na coleta de agosto/2020 (Tabela 21), o fipronil sulfona foi quantificado em todas as amostras, exceto no PI1, com o maior valor encontrado de 0,2 pg/g nos mesocosmos

dos *plots* PE1 e PE2. Para esses tratamentos não houve diferença estatística em relação ao controle quanto à mortalidade dos organismos, portanto não foi possível relacionar os subprodutos do fipronil com efeitos ecotoxicológicos sobre o *C. sancticaroli*.

A Figura 53 ilustra o resultado do teste de toxicidade com *C. sancticaroli*, em termos do comprimento corporal médio dos organismos, para amostras coletadas em janeiro/2020 nos mesocosmos, sendo observada diferença estatística das amostras do PE1, PI3 e PI5 em relação ao controle ($p < 0,05$). A Figura 54 apresenta o resultado como média de cada tratamento, não sendo observada diferença estatística entre o controle e a média dos tratamentos ($p > 0,05$). As médias do crescimento para cada tratamento de solo foram de 9,4 mm (PE), 11,3 mm (PI) e 11,1 mm (C), todos abaixo do observado no controle (11,6 mm).

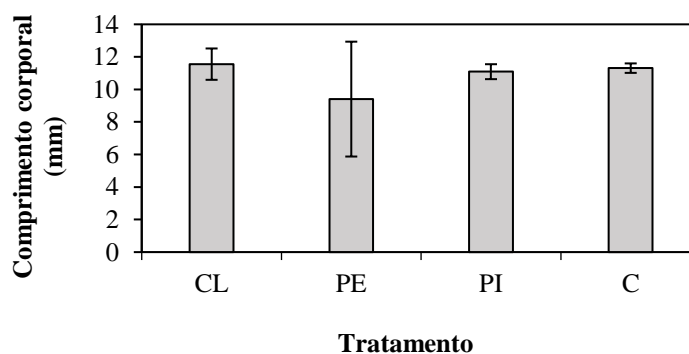
Figura 53 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio corporal da espécie *C. sancticaroli*, para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de janeiro/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Figura 54 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio corporal da espécie *C. sancticaroli*, como média de cada tratamento (coleta de janeiro/2020)

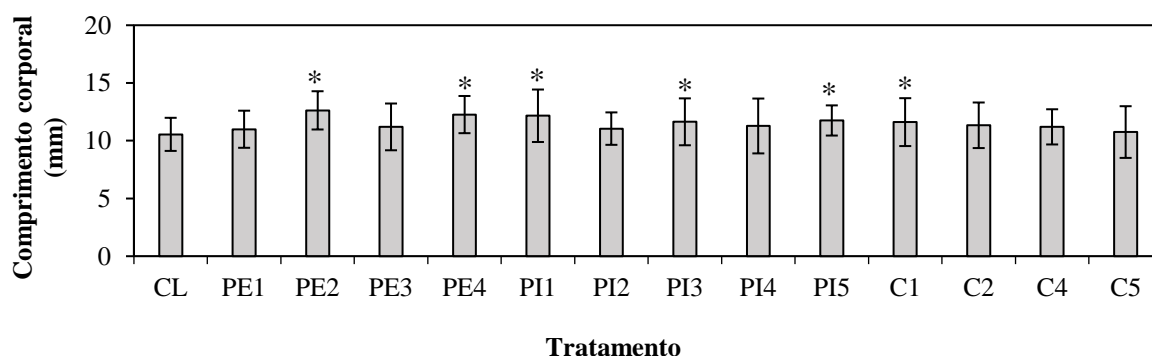


Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria

A Figura 55 ilustra o teste de toxicidade para as amostras coletadas em agosto/2020, sendo observada diferença estatística para os mesocosmos PE2, PE4, PI1, PI3, PI5 e C1 em relação ao controle ($p < 0,05$). A média de cada tratamento é apresentada na Figura 56, sendo observada diferença estatística entre os comprimentos do controle e dos tratamentos PE e PI ($p < 0,05$). A maior média no crescimento corporal foi observada no tratamento PE (11,8 mm) e a menor, no C (11,2 mm).

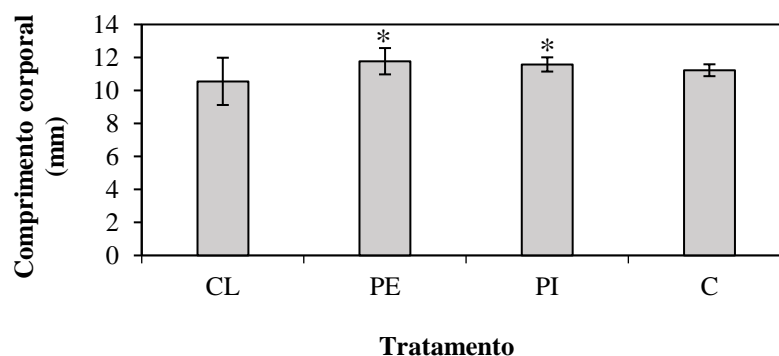
Figura 55 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio corporal da espécie *C. sancticaroli*, para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de agosto/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Figura 56 – Resultados do teste de toxicidade sobre o comprimento médio corporal da espécie *C. sancticaroli*, como média de cada tratamento (coleta de agosto/2020)



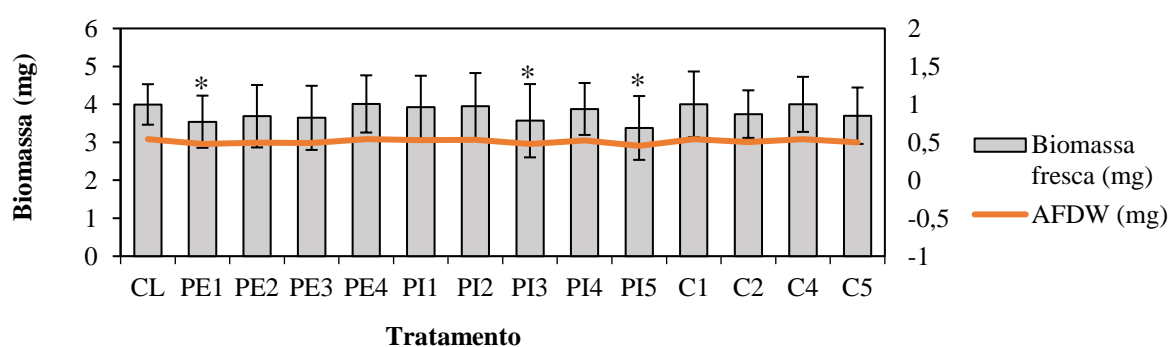
Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

A partir do comprimento corporal das larvas, foram calculados os valores médios para biomassa fresca e AFDW, ao fim dos testes com *C. sancticaroli*. A Figura 57 e Figura 58 apresentam os resultados para os testes realizados com amostras de janeiro/2020 e a Figura 59

e Figura 60, para agosto/2020. Na coleta de janeiro foi observada diferença estatística das amostras do PE1, PI3 e PI5 em relação ao controle ($p < 0,05$). Quanto à média dos tratamentos, não foi observada diferença estatística entre o controle e os tratamentos ($p > 0,05$) em janeiro, porém com as amostras da coleta de agosto houve diferença para a média dos tratamentos PE e PI ($p < 0,05$), tanto para biomassa fresca quanto para AFDW. Em agosto, houve diferença estatística para os mesocosmos PE2, PE4, PI1, PI3, PI5 e C1 em relação ao controle ($p < 0,05$).

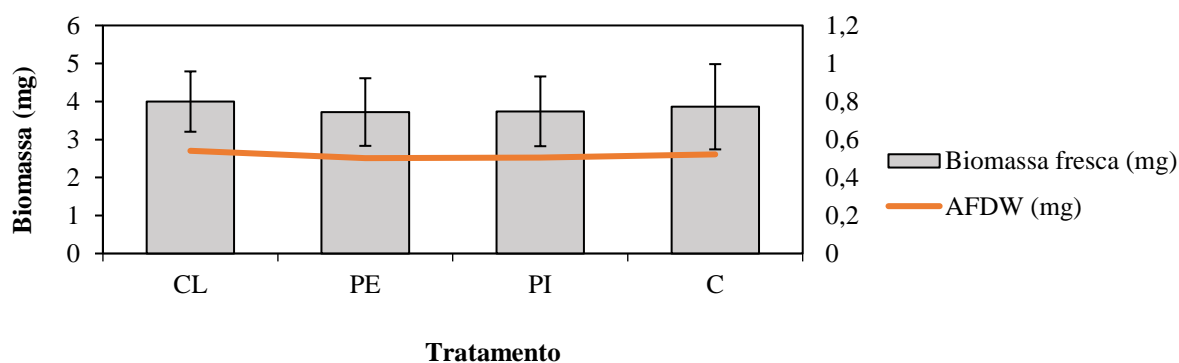
Figura 57 – Biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas da espécie *C. sancticaroli* ao fim do teste de toxicidade (coleta de janeiro/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; AFDW – biomassa seca livre de cinzas.

Fonte: Autoria própria

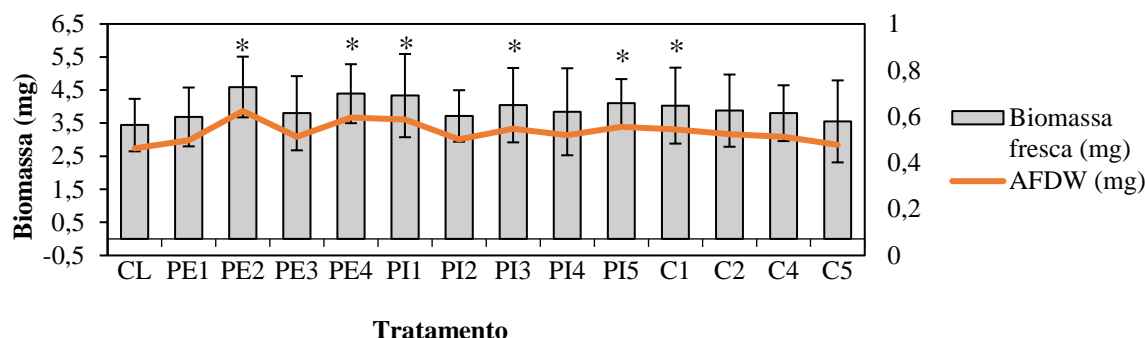
Figura 58 – Biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas da espécie *C. sancticaroli* ao fim do teste de toxicidade, como média de cada tratamento (coleta de janeiro/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; AFDW – biomassa seca livre de cinzas.

Fonte: Autoria própria

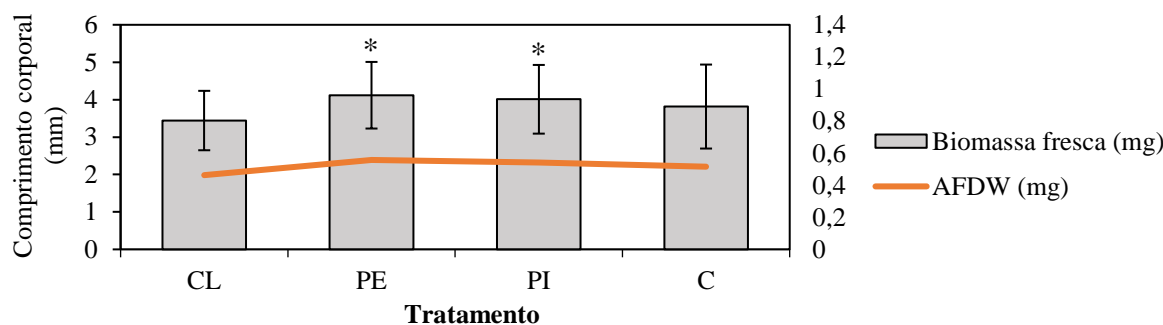
Figura 59 – Biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas da espécie *C. sancticaroli* ao fim do teste de toxicidade (coleta de agosto/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; AFDW – biomassa seca livre de cinzas.

Fonte: Autoria própria

Figura 60 – Biomassa fresca e biomassa seca livre de cinzas da espécie *C. sancticaroli* ao fim do teste de toxicidade, como média de cada tratamento (coleta de agosto/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; AFDW – biomassa seca livre de cinzas; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

No modelo testado por Péry et al. (2002) com *Chironomus riparius*, os autores constataram que as larvas possuem baixos custos de manutenção, ou seja, todo o alimento absorvido pelas larvas é convertido em biomassa durante o desenvolvimento corporal. Além disso, organismos estressados por contaminantes ambientais provavelmente terão menos energia disponível para crescimento e reprodução do que organismos não estressados, logo o crescimento corporal constitui uma medida importante para avaliação da toxicidade subletal do sedimento (LIBER et al., 1996). A exposição contínua a estressores pode, portanto, levar a graves declínios populacionais e até mesmo extinção local da espécie. Esse cenário se mostra muito preocupante, uma vez que os quironomídeos constituem um dos grupos dominantes de insetos de água doce em regiões tropicais e esses organismos constituem uma parte substancial das dietas de muitos animais aquáticos e terrestres (CHURA, 1961). Corbi e

Trivinho-Strixino (2008) analisaram a fauna de macroinvertebrados em 11 riachos da bacia Jacaré-Guaçu, no estado de São Paulo e, em todos eles, os quironomídeos dominaram a fauna, com 70% do total de macroinvertebrados coletados e porcentagens de 54 a 90% de predominância em cada riacho.

A partir de teste crônico de 28 dias com fipronil, Monteiro et al. (2019) demonstraram que o crescimento larval do quironomídeo *C. riparius* se configura como um *endpoint* sensível para a exposição do organismo a agrotóxicos. Os autores obtiveram LOEC (menor concentração de efeito observado) igual a 0,081 µg/L e observaram uma redução de 40% no comprimento larval na concentração mais alta testada (0,162 µg/L), relacionando-a à consequência direta do efeito neurotóxico do fipronil, por meio de atividade reduzida e inibição de alimentação, ou consequência indireta da realocação de energia a outros processos biológicos. No entanto, é importante ressaltar que em ecossistemas aquáticos os organismos estão expostos a diversas substâncias estressoras, portanto as respostas medidas em uma condição controlada de laboratório podem não corresponder às respostas geradas no ambiente natural (PESTANA et al., 2010).

Pinto et al. (2021) avaliaram o impacto do 2,4-D e do fipronil sobre o *C. sancticaroli*, constatando que as larvas expostas ao 2,4-D tiveram comprimento corporal e biomassa semelhantes aos do controle em todas as concentrações testadas, enquanto na concentração mais baixa de fipronil (0,3 µg/L), o comprimento do corpo, biomassa fresca e AFDW diminuíram significativamente. Para a concentração mais alta de fipronil (3,7 µg/L), os autores observaram que o comprimento corporal das larvas expostas ao inseticida foi 42% menor do que o controle. Conforme visto no decorrer do presente trabalho, a maior concentração de fipronil quantificada no sedimento foi de 48,4 pg/g (C5, janeiro/2020), portanto devido à complexidade da amostra não se pode afirmar que apenas o inseticida foi responsável pelo menor desenvolvimento das larvas, mas a interação com diversas substâncias presentes na amostra ambiental e que não foram quantificadas no estudo.

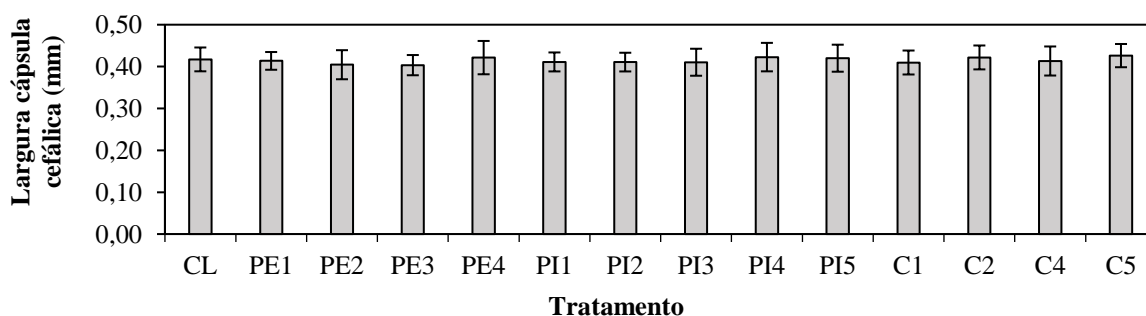
Comparando-se os resultados para as duas coletas, observa-se que houve um aumento de biomassa fresca para os tratamentos PE e PI. Em janeiro/2020, a biomassa fresca foi estimada em 3,72 mg no PE e 3,74 mg no PI. Já em agosto/2020, houve um aumento para 4,12 mg no PE e 4 mg no PI, sendo maiores que o controle e estatisticamente diferente do mesmo ($p < 0,05$). Como constatado ao longo deste estudo, as concentrações de agrotóxicos, nutrientes e metais quantificados nas amostras se mostraram mais elevadas em janeiro, dada a

proximidade à data de aplicação dos produtos nos tratamentos do solo. Assim, relaciona-se o menor desenvolvimento das larvas à maior presença de substâncias estressoras de modo geral nas amostras, que estão em mistura e sob influência de outros aspectos do ambiente natural. Na mistura de agrotóxicos, também deve-se levar em conta o sinergismo, ou seja, quando um produto acentua a ação de outro e o efeito em mistura é maior do que o individual. No estudo de Pinto et al. (2021) também foi demonstrado o sinergismo entre 2,4-D e fipronil na espécie *C. sancticaroli*, principalmente para misturas com maiores concentrações de fipronil.

Além disso, é importante ressaltar que a diferença estatística observada entre o controle e os tratamentos PE e PI para os *endpoints* de crescimento corporal, biomassa fresca e AFDW foi de que os organismos dos tratamentos da pastagem apresentaram um desenvolvimento mais acentuado do que os do grupo controle. Isso pode ter sido influenciado pela melhor qualidade do sedimento na coleta de agosto em relação a janeiro. Conforme visto anteriormente na Tabela 13 e Tabela 21, a maior concentração de fipronil quantificada no sedimento do pasto intensivo em janeiro/2020 foi de 39,6 pg/g (PI1), enquanto em agosto foi de 1,1 pg/g (PI3), portanto o teor do inseticida reduziu entre as duas coletas, provavelmente refletindo na melhora da qualidade do sedimento.

A Figura 61 apresenta as medidas da largura da cápsula cefálica ao fim dos testes com *C. sancticaroli* para as amostras coletadas em janeiro/2020. Na Figura 62 está a média para cada tratamento. Para esta coleta, não foi observada diferença estatística entre o controle e os tratamentos ($p > 0,05$). Além disso, a partir da largura da cápsula cefálica determinou-se que 47% dos organismos se encontravam no instar IV, enquanto 53% se encontravam na transição do instar III para o IV.

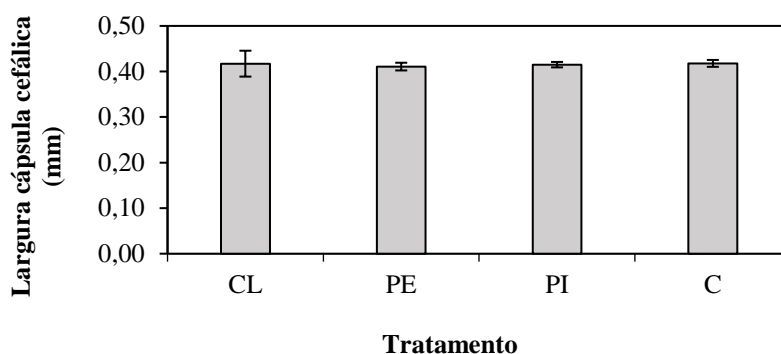
Figura 61 – Largura da cápsula cefálica da espécie *C. sancticaroli* ao fim do teste de toxicidade para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de janeiro/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria

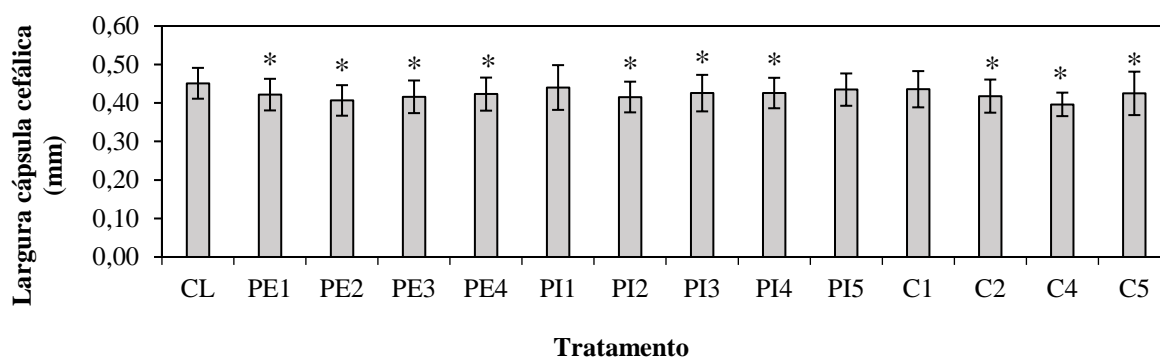
Figura 62 – Largura da cápsula cefálica da espécie *C. sancticaroli* ao fim do teste de toxicidade como média de cada tratamento (coleta de janeiro/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar.
Fonte: Autoria própria

A Figura 63 apresenta as medidas da largura da cápsula cefálica ao fim dos testes com *C. sancticaroli* para as amostras coletadas em agosto/2020. Na Figura 64 está a média para cada tratamento. Para este *endpoint*, foi observada diferença estatística entre o controle e a média dos tratamentos PE, PI e C ($p < 0,05$), sendo que individualmente houve diferença estatística para os mesocosmos PE1, PE2, PE3, PE4, PI2, PI3, PI4, C2, C4 e C5 em relação ao controle ($p < 0,05$). Além disso, a partir da largura da cápsula cefálica determinou-se que 57% dos organismos se encontravam no 4º instar, 42% se encontravam na transição do instar III para o IV e 0,5% entre o instar II e III.

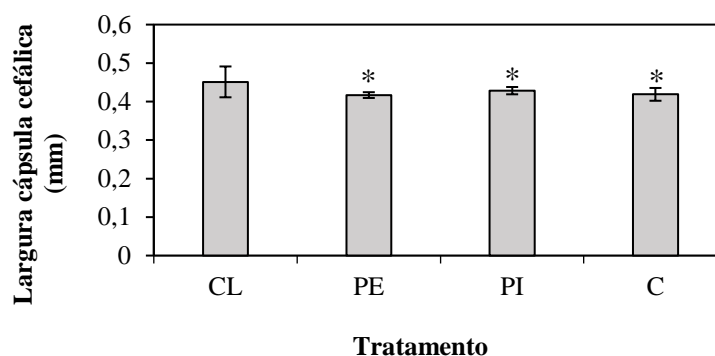
Figura 63 – Largura da cápsula cefálica da espécie *C. sancticaroli* ao fim do teste de toxicidade para amostras de água de cada mesocosmo (coleta de agosto/2020)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Figura 64 – Largura da cápsula cefálica da espécie *C. sancticaroli* ao fim do teste de toxicidade como média de cada tratamento (coleta de agosto/2020). Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$)



Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

No estudo de Pinto et al. (2021) foi constatado que a exposição do *C. sancticaroli* ao 2,4-D e ao fipronil causa diminuição na largura da cápsula cefálica. O 2,4-D causou esse efeito na maior concentração testada pelos autores (426 $\mu\text{g/L}$), enquanto o fipronil, na concentração de 1,3 $\mu\text{g/L}$, causou uma redução significativa na largura da cápsula cefálica dos quironomídeos. Além disso, a maior concentração testada de fipronil (3,7 $\mu\text{g/L}$) causou um atraso no desenvolvimento dos organismos, com apenas 46% das larvas chegando ao instar IV ao fim do teste de toxicidade. Conforme visto no presente estudo, a maior concentração quantificada de agrotóxicos no sedimento dos mesocosmos foi de 48,4 pg/L (fipronil, C5, janeiro/2020) e, nas amostras de agosto, foi observada diferença estatística entre o controle e os tratamentos PE, PI e C, para a largura da cápsula cefálica. Conforme mencionado anteriormente, o efeito pode não estar relacionado diretamente ao fipronil (devido às baixas concentrações), mas sim à mistura de agentes estressores presentes no sedimento que impactaram no desenvolvimento das larvas. Além disso, o esperado era que, de acordo com o ciclo de vida do *C. sancticaroli*, a maioria das larvas atingissem o instar IV ao final dos 8 dias (FONSECA; ROCHA, 2004), porém para ambas as coletas do presente estudo muitos organismos ainda se encontravam na transição do instar III para o IV (53% em janeiro/2020 e 42% em agosto). No controle de laboratório, muitas larvas também estavam na faixa de transição entre o instar III e IV (56% em janeiro/2020 e 68,8% em agosto/2020), podendo estes resultados estarem relacionados ao método de medição da cápsula cefálica, que pode diferir de pessoa a pessoa. Além disso, deve-se considerar a variação em relação à biologia

dos organismos, portanto é esperado que alguns organismos não se encaixem exatamente no intervalo de valores determinados por Fonseca e Rocha (2004), uma vez que se trata de uma faixa de variações médias.

Na Tabela 30 está sintetizada a frequência de deformidades de mento observadas nas larvas de *C. sancticaroli*, referente à coleta de janeiro/2020. Foi observada diferença estatística dos mesocosmos PI5 (16,7%, $p < 0,05$) e C5 (25%, $p < 0,05$) em relação ao controle quanto ao total de larvas deformadas. Para a média dos tratamentos, a pastagem intensiva e cana-de-açúcar apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). As deformidades observadas para as amostras de janeiro/2020 foram a falta e excesso de dente, sendo registrada com maior frequência a de excesso de dente, com maiores porcentagens nos *plots* PI5 e C5 (13,3 e 21,4%, respectivamente).

Tabela 30 – Frequência de deformidade de mento e alterações das larvas saudáveis com dentes desgastados (coleta de janeiro/2020).

Tratamento	Deformidades					Total de larvas deformadas	Frequência de dentes desgastados		
	n	Falta de dente		Excesso de dente			n	%	
CL	36	1	2,8%	0	0,0%	1	2,8%	4	11%
PE1	24	1	4,2%	2	8,3%	3	12,5%	0	0%
PE2	30	2	6,7%	1	3,3%	3	10,0%	0	0%
PE3	29	0	0,0%	2	6,9%	2	6,9%	0	0%
PE4	29	1	3,4%	1	3,4%	2	6,9%	0	0%
$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$							9±3%		
PI1	29	0	0,0%	2	6,9%	2	6,9%	0	0%
PI2	28	0	0,0%	3	10,7%	3	10,7%	0	0%
PI3	29	1	3,4%	2	6,9%	3	10,3%	0	0%
PI4	28	0	0,0%	3	10,7%	3	10,7%	0	0%
PI5	30	1	3,3%	4	13,3%	5	16,7%*	0	0%
$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$							11±4%*		
C1	24	0	0,0%	3	12,5%	3	12,5%	0	0%
C2	29	1	3,4%	3	10,3%	4	13,8%	0	0%
C4	25	0	0,0%	2	8,0%	2	8,0%	0	0%
C5	28	1	3,6%	6	21,4%	7	25,0%*	0	0%
$\bar{X}_C \pm \sigma$							15±7%*		

Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar; Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 31 constam as deformidades referentes à coleta de agosto/2020. Não foi observada diferença estatística entre o controle e os tratamentos ($p > 0,05$), e a frequência do total de larvas deformadas diminuiu, se comparada à coleta de janeiro. Para essas amostras, as maiores porcentagens observadas foram de 11,5 e 11,1%, nos *plots* PE1 e C1, respectivamente.

Tabela 31 – Frequência de deformidade de mento e alterações das larvas saudáveis com dentes desgastados (coleta de agosto/2020).

Tratamento	n	Deformidades						Total de larvas deformadas		Frequência de dentes desgastados	
		Falta de dente		Excesso de dente		Bifurcação do dente central		n	%	n	%
CL	32	1	3,1%	0	0,0%	1	3,1%	1	3,1%	3	9%
PE1	26	0	0,0%	3	11,5%	0	0,0%	3	11,5%	0	0%
PE2	25	2	8,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	8,0%	0	0%
PE3	29	1	3,4%	2	6,9%	0	0,0%	3	10,3%	0	0%
PE4	26	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0%
								$\bar{X}_{PE} \pm \sigma$	7±5%		
PI1	24	1	4,2%	0	0,0%	0	0,0%	1	4,2%	0	0%
PI2	30	1	3,3%	1	3,3%	0	0,0%	2	6,7%	0	0%
PI3	26	1	3,8%	1	3,8%	0	0,0%	2	7,7%	0	0%
PI4	27	0	0,0%	1	3,7%	0	0,0%	1	3,7%	0	0%
PI5	23	0	0,0%	1	4,3%	0	0,0%	1	4,3%	0	0%
								$\bar{X}_{PI} \pm \sigma$	5±2%		
C1	27	2	7,4%	1	3,7%	0	0,0%	3	11,1%	0	0%
C2	28	0	0,0%	1	3,6%	0	0,0%	1	3,6%	0	0%
C4	28	0	0,0%	1	3,6%	0	0,0%	1	3,6%	1	4%
C5	28	1	3,6%	2	7,1%	0	0,0%	3	10,7%	0	0%
								$\bar{X}_C \pm \sigma$	7±4%		

Notas: CL – controle; PE – pasto extensivo; PI – pasto intensivo; C – cana-de-açúcar.

Fonte: Autoria própria

Conforme Tabela 13, o fipronil foi quantificado majoritariamente nos sedimentos do tratamento C, com a maior concentração obtida no mesocosmo inserido no *plot* C5 (48,4 pg/L, janeiro/2020), no qual também foi observada a maior frequência de deformidade de mento. Nos testes crônicos de Pinto et al. (2021) foi constatado que o 2,4-D não alterou a incidência de deformidade no mento do *C. sancticaroli* em nenhuma das concentrações testadas, enquanto que para o fipronil, mesmo em baixas concentrações (0,3; 0,4 e 0,7 µg/L), observaram-se altas taxas de deformidade, sendo a falta de dente a mais frequente. Segundo os autores, a hipótese é de que a alta ocorrência de deformidades é resultado de uma alteração hormonal causada pela exposição ao inseticida. Além disso, também foi observado um

aumento na frequência de dentes desgastados, variando de 15 a 39% nas concentrações mais baixa e mais alta de fipronil, respectivamente, enquanto a frequência foi baixa ou ausente para o controle e 2,4-D. No presente estudo, a diferença estatística do tratamento C em relação ao controle quanto às deformidades ($p < 0,05$) somada à maior quantificação de fipronil neste tratamento muito provavelmente indica o efeito do inseticida sobre as larvas do *C. sancticaroli*. Já na coleta de agosto/2020 as concentrações de agrotóxicos nos sedimentos foram bem menores, coincidindo com a queda nas taxas de deformidades obtidas no teste ecotoxicológico.

Também foi demonstrado na literatura que a exposição do quironomídeo *C. tentans* à metais como zinco, chumbo, cádmio e cobre aumenta a frequência de deformidades de mento (MARTINEZ et al., 2001; MARTINEZ et al., 2003). Além disso, os autores afirmam que diferentes taxas de deformidade são esperadas para cada fase do desenvolvimento das larvas (instares), e que a exposição a metais para os organismos detritívoros é mais provável de ocorrer através da ingestão de sedimentos contaminados ao invés da exposição direta à água. No presente estudo não foi realizada a quantificação de metais no sedimento, porém a partir do que foi observado nas amostras de água levanta-se a hipótese de os mesmos também podem ter influenciado na ocorrência de deformidade nas larvas, uma vez que os metais presentes na coluna d'água têm a tendência de se aderirem às partículas de sólidos em suspensão, ficando assim retidos e podendo contaminar o sedimento (ESTEVEES, 1998). Além disso, não foi encontrado na literatura testes com quironomídeos envolvendo o alumínio, e no *plot* C5 foi obtida a maior concentração desse metal na água (0,9 mg/L, janeiro/2020), o que também pode indicar uma possível correlação com as deformidades e servir de base para futuros estudos.

6 CONCLUSÕES

Destacam-se as seguintes conclusões importantes obtidas ao longo do desenvolvimento desta pesquisa:

- A partir da quantificação do herbicida DMA 806 BR (2,4-D) e do inseticida Regent 800 WG (fipronil) nas amostras de água dos mesocosmos, pode-se aferir que o tipo de cobertura do solo, o local de aplicação dos produtos e o período do ano (seco ou chuvoso) exercem influência sobre o transporte dos agrotóxicos para o corpo hídrico;
- Após a aplicação de agrotóxicos, fertilizantes e vinhaça nos tratamentos de solo, o arraste de material é a forma de contribuição difusa para o aumento na concentração de nutrientes e metais, o que contribui para alterações na qualidade da água dos corpos hídricos experimentais. Adicionalmente, a aplicação dos produtos, feita por aspersores, também pode contribuir para a distribuição dos mesmos em outras áreas, em função da ação do vento;
- O carreamento de nutrientes para o interior dos mesocosmos, proveniente da fertilização (NPK), fertirrigação (vinhaça) e dejetos do gado, somado à decomposição das macrófitas, provavelmente contribuíram para a eutrofização dos modelos experimentais.
- Verifica-se que o manejo aplicado na intensificação do pasto e na cana-de-açúcar tem efeitos nas características físicas, químicas e biológicas dos mesocosmos, embora nem sempre tenha uma correspondência direta na toxicidade, avaliada por meios de testes de toxicidade aguda e crônica;
- Dentre as variáveis climáticas analisadas, a precipitação exerceu maior influência sobre os resultados obtidos, principalmente por aumentar o transporte de nutrientes, agrotóxicos e metais através do escoamento superficial;
- As amostras de água e sedimento dos mesocosmos causaram efeitos sobre as espécies testadas, portanto foram afetadas pelo tipo de manejo do solo referente a cada tratamento. No entanto, nem sempre os tratamentos com maior manejo foram aqueles que implicaram em maior efeito, o que demonstra a complexidade dos sistemas e a dificuldade em se quantificar de forma mais efetiva os reais efeitos das atividades antropogênicas, como ocorrido nesta pesquisa;

- As amostras de água causaram efeito sobre a reprodução da *C. silvestrii*, provavelmente recebendo influência das condições de campo (como a concentração de cromo) e da presença dos agrotóxicos e vinhaça em mistura;
- A exposição do *C. sancticaroli* às amostras de sedimento dos mesocosmos levou ao aumento das deformidades nos organismos-teste, principalmente no tratamento da cana-de-açúcar, onde foi quantificada a maior concentração de fipronil;
- A germinação das sementes e o comprimento da raiz e parte aérea da *E. sativa* indicaram uma possível influência da concentração de nutrientes para o melhor desenvolvimento das plantas, observado principalmente com as amostras do tratamento da cana-de-açúcar, onde houve o uso de fertilizantes (NPK) e fertirrigação com vinhaça;
- A presença do 2,4-D e do fipronil em amostras de água ou sedimento por um longo período após a sua aplicação é indicativo da persistência desses agrotóxicos no ambiente, e traz preocupações sobre os efeitos dos mesmos sobre a comunidade aquática em médio e longo prazo, o que pode interferir na estruturação biológica e nas funções e serviços ecossistêmicos;
- Os resultados obtidos trazem novas informações acerca da toxicidade de agroquímicos utilizados no cultivo de cana-de-açúcar sobre três espécies distintas (*Ceriodaphnia silvestrii*, *Eruca sativa* e *Chironomus sancticaroli*), que podem contribuir para a avaliação dos riscos ambientais de práticas de fertirrigação e controle de pragas.

REFERÊNCIAS

- AAJOUND, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1347-1352, 2003.
- ADAMI, M. et al. Remote sensing time series to evaluate direct land use change of recent expanded sugarcane crop in Brazil. **Sustainability**, v. 4, p. 574– 585, 2012.
- ADAMS, W. J. Aquatic toxicology testing methods. *In*: HOFFMAN, D. J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis, 1995. Cap. 13, p. 25-46.
- ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: processes & impacts**, v. 18, n. 7, p. 779-787, 2016.
- ALI, A.; NAYAR, J. K.; GU, W. D. Toxicity of a phenylpyrazole insecticide, fipronil, to mosquito and chironomid midge larvae in the laboratory. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 14, n. 2, p. 216-218, 1998.
- AL-QURAINY, F. Application of inter simple sequence repeat (ISSR marker) to detect genotoxic effect of heavy metals on *Eruca sativa* (L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, 2010.
- AL-SHAMI et al. Toxicity of two herbicides 2, 4-D dimethylamine and bensulfuron methyl to rice field *Chironomus kiiensis* (Tokunaga)(Diptera: Chironomidae). *湿地科学*, v. 4, 2006.
- ALVES, P. R. L. et al. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of The Total Environment**, v. 526, p. 222–232, 2015.
- ALVES, S. R.; OLIVEIRA-SILVA, J. J. Avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos. *In*: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Org.). **É Veneno ou é remédio: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. Cap. 7, p. 137-156.
- AMARANTE, O. P. et al. Determination of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis. *Talanta*, v. 60, n. 1, p. 115-121, 2003.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION; WATER CONTROL FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19thed. New York, 1995.
- ANDERSON, M. J.; TER BRAAK, C. J. F. Permutation tests for multi-factorial analysis of variance. **Journal of Statistical Computation and Simulation**, v. 73, n. 2, p. 85–113, 2003.
- ANDRADE, C. M. S.; FERREIRA, A. S.; FARINATTI, L. H. E. Tecnologias para intensificação da produção animal em pastagens: fertilizantes x leguminosas. *In*: Embrapa Acre-Artigo em anais de congresso (ALICE). *In*: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA

PASTAGEM, 26., 2011, Piracicaba. A empresa pecuária baseada em pastagens: anais. Piracicaba: FEALQ, 2011., 2011.

ANDRADE, V. S. et al. Influence of rainfall and seasonal crop practices on nutrient and pesticide runoff from soybean dominated agricultural areas in Pampean streams, Argentina. **Science of The Total Environment**, v. 788, p. 147676, 2021.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard method for the examination of water and waste water**. Washington, D.C, US: APHA, 1995.

ARAÚJO, W.P. Manejo da fertirrigação em mudas de alface produzidas em substrato. 70f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2003.

ARGENTON, E. C. **Limnologia, balneabilidade e impactos ambientais: uma análise temporal e espacial na represa do Lobo (Broa), Itirapina/Brotas – SP**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

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

ARMAS, E. D. **Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) na sub-bacia do rio Corumbataí**. 2006. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12621**: Águas - determinação da dureza total - método titulométrico do EDTA - Na- método de ensaio. Rio de Janeiro: ABNT, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Ecotoxicologia aquática — toxicidade crônica — método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard guide for conducting acute toxicity testing on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians, West Conshohocken, PA, pp. E729-E796, ASTM, 2001.

ATAMANIUK, T. M. et al. Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D): studies with goldfish gills. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 10, p. 1498-1508, 2013.

AZEVEDO, J. C. R. et al. Contribuição da decomposição de macrófitas aquáticas (*Eichhornia azurea*) na matéria orgânica dissolvida. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 1, p. 5, 2008.

BAGGIO FILHO, H. Contribuições naturais e antropogênicas para a concentração e distribuição de metais pesados em água superficial e sedimentos de corrente na Bacia do Rio do Formoso, município de Buritizeiro-MG. 2008.

BAGGIO, H.; ARAUJO, A. D.; FREITAS, M. O. Análise dos parâmetros físico-químicos oxigênio dissolvido, condutividade elétrica, potencial hidrogenionico e temperatura, no baixo curso do rio das Velhas-MG. **CAMINHOS DE GEOGRAFIA**, v. 17, n. 60, p. 105-117, 2016.

BAGLIANO, R. V. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 3-17, 2012

BARBOSA FILHO, M. P. et al. Silicato de cálcio como fonte de silício para o arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 325-330, 2001.

BEELER, A.; SCHLENK, D.K. Synthesis of fipronil sulfide, an active metabolite, from the parent insecticide fipronil. **Tetraedron Letters**, v. 42, p. 32, p. 5371-5372, 2001.

BEGGEL, S. et al. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3169–3175, 2010.

BEM, C. C. Determinação do estado de eutrofização de um lago raso. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

BERNARDI, A. C de C. Potássio em solos sob pastagem intensiva. In: Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: APOIO AO USO BALANCEADO DE POTÁSSIO NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2013, Piracicaba. 10 anos de parceria IPI e Embrapa-Resumos expandidos. Piracicaba: IPI, 2013., 2013.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

BEWLEY, J. D; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: development, germination, and growth**. Berlin: Springer-Verlag, 2014.

BEYRUTH, Z. Macrófitas aquáticas de um lago marginal ao rio Embu-mirim, São Paulo, Brasil. **Revista de saúde pública**, v. 26, p. 272-282, 1992.

BHAT, S. V. et al. Oxidative stress and metabolic perturbations in *Escherichia coli* exposed to sublethal levels of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Chemosphere**, v. 135, p. 453-461, 2015.

BISTHOVEN, L. G. J.; TIMMERMANS, K. R.; OLLEVIER, F. The Concentration of cadmium, lead, copper and zinc in Chironomus gr. larvae (Diptera, Chironomidae) with deformed versus normal menta. **Hydrobiologia**, v. 239, n. 3, p. 141–149, 1992.

BLOOMQUIST, J. R. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**: published in collaboration with the entomological society of america, v. 54, n. 4, p.145-156, 2003.

BONANI, F. **Avaliação de deformidades morfológicas em larvas de Chironomus (Diptera, Chironomidae) na bacia do rio Piracicaba e sua aplicação no biomonitoramento**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

BORDONAL, R. O. et al. Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, n. 2, p. 13, 2018.

BORGES, S. et al. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead. USEPA Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs, USA, 2004.

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

BOURLEGAT, F. M. L. **Disponibilidade de metais em amostras de fosfogesso e fertilizantes fosfatados utilizados na agricultura**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BOUWMAN, A. F.; BEUSEN, A. H. W.; BILLEN, G. Human alteration of the global nitrogen and phosphorus soil balances for the period 1970–2050. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 23, n. 4, 2009.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Programa RenovaBio**. 2017. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e-combustiveis/renovaveis/programas/renovabio/principal>. Acesso em: 3 jul. 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 mar. 2005, n. 53, p. 58-63.

BROVINI, E. M. et al. Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 771, article number 144754, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>.

CARPENTER, S. R. et al. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. **Ecological applications**, v. 8, n. 3, p. 559-568, 1998.

CASALI-PEREIRA, M. P.; DAAM, M.A.; RESENDE, J. C.; VASCONCELOS, A. M.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; BOTTA, C. M. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient

abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere** 139:558–564, 2015.

CEREJEIRA, M. J. et al. Pesticides in portuguese surface and ground waters. **Water Research**, v. 37, n. 5, p. 1055–1063, 2003.

CEZÁRIO, A. S. et al. Silages of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu harvested at two regrowth ages: microbial inoculant responses in silage fermentation, ruminant digestion and beef cattle performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 208, p. 33-43, 2015.

CHATON, P. F. et al. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding sites. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 1, p. 8-12, 2002.

CHURA, N. J. Food availability and preferences of Juvenile Mallards. In: TRANSACTIONS OF THE NORTH AMERICAN WILDLIFE CONFERENCE, 26., 1961, Washington. **Proceedings [...]**. Washington: Wildlife Management Institute, 1961. v. 2, p. 121–134.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Proposta para derivação de critérios para contaminantes ambientais da agricultura**. São Paulo: CETESB, 2010. Relatório Técnico.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Determinação de Clorofila a, e Feofitina a: método espectrofotométrico**. Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I, v.124 (71) de 15/04/14, Poder Executivo, Seção I, p. 53 a 55. São Paulo: CETESB, 2014. Norma Técnica.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas superficiais do estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2018. Relatório Técnico.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas superficiais do estado de São Paulo**. Apêndice D, São Paulo: CETESB, 2019a. Relatório Técnico.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas superficiais do estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2019b. Relatório Técnico.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas superficiais do estado de São Paulo**. Apêndice C, São Paulo: CETESB, 2020. Relatório Técnico.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Cana-de-Açúcar – Análise Mensal – Abril-Maio 2021. Histórico Mensal Cana-de-açúcar**. Brasília: CONAB, 2021.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília: CONAB, 2022. (v.9 – safra 2022/23 n.1 – primeiro levantamento, 2022).

CORBI, J. J. et al. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, v. 29, p. 61-65, 2006.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Relationship between sugar cane cultivation and stream macroinvertebrate communities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 569–579, 2008.

CORRÊA, J. C.; REICHARDT, K. Efeito do tempo de uso das pastagens sobre as propriedades de um Latossolo Amarelo da Amazônia Central. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 107-114, 1995.

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, 2016.

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

COSTA, F. P.; REHMAN, T. Exploring the link between farmers' objectives and the phenomenon of pasture degradation in the beef production systems of Central Brazil. **Agricultural Systems**, v. 61, n. 2, p. 135–146, 1999.

COSTA, R. D. **Nutrientes na água do escoamento superficial em sistema plantio direto com mulching vertical**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

CUNHA, J. P. A. R. Simulação da deriva de agrotóxicos em diferentes condições de pulverização. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1616-1621, 2008.

DAS, P. C. et al. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, n. 3, p. 200-214, 2006.

DELELLO, D. **Composição e distribuição (espacial e temporal) de macrófitas aquáticas no reservatório do Lobo (Broa)**. 2008. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico das pastagens no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. p. 36. (Documentos, 402). Disponível em: www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online. Acesso em: 2 jul. 2019.

ELIAS NETO, A.; NAKAHODO, T. **Caracterização físico-química da vinhaça**: projeto nº 9500278. Piracicaba: Seção de Tecnologia de Tratamento de Águas do Centro de Tecnologia Copersucar, 1995. (Relatório Técnico).

ENSINAS, S. C. et al. Fertirrigação na formação de mudas de rúcula em diferentes substratos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 12, n. 3, p. 238-246, 2014.

EUCLIDES, V. P. B. et al. Pasture and grazing management of *Brachiaria brizantha* (Hochst) Stapf and *Panicum maximum* Jacq. **Revista Ceres**, v. 61, p. 808-818, 2014.

ESTEVES, F. A. Fundamentos de limnologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FARAH, M. A. et al. Studies on lethal concentrations and toxicity stress of some xenobiotics on aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 55, n. 2, p. 257-265, 2004.

FERREIRA, A. L. N. Exposição de crómio em alface: acumulação e efeitos na fisiologia e genotoxicidade. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.

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, 2011.

FIGUEIRÊDO, M. C. B. et al. Avaliação da vulnerabilidade ambiental de reservatórios à eutrofização. *Engenharia sanitária e ambiental*, v. 12, n. 4, p. 399-409, 2007.

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

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

FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. 275 p. Bauru: Canal 6, 2017.

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

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

- FRACÁCIO, R. **Utilização de bioensaios ecotoxicológicos com *Danio rerio* (Cypriniforme, Cyprinidae) e análises limnológicas para a avaliação ambiental dos reservatórios do Médio e Baixo Tietê (SP)**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
- 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, Oct., 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109446.
- FRIESE, K. et al. Anthropogenic influence on the degradation of an urban lake–The Pampulha reservoir in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Limnologica*, v. 40, n. 2, p. 114-125, 2010.
- FRIMPONG, J. O. et al. Evaluating the impact of synthetic herbicides on soil dwelling macrobes and the physical state of soil in an agro-ecosystem. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 205–215, Mar. 2018.
- FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, n. 1, p. 210-229, 2014.
- CASTELHANO GEBARA, Renan et al. Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 10, p. 2912-2922, 2021.
- GAMA, A. F. Avaliação espaço/temporal e influência da composição sedimentar na distribuição dos agrotóxicos mais utilizados na mesorregião do Rio Jaguaribe-Ceará. 2018.
- GENSEMER, R. W. et al. Evaluating the effects of pH, hardness, and dissolved organic carbon on the toxicity of aluminum to freshwater aquatic organisms under circumneutral conditions. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 37, n. 1, p. 49-60, 2018.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et al. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990.
- GIRARDI, F. Tratamento de vinhaça utilizando coagulantes naturais. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2009.
- GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. Energy and environment in Brazil. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, p. 7–20, 2007.
- GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The Sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, n. 6, p. 2086–2097, 2008.
- GOLTERMAN, H. L; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for chemical and physical analysis of freshwater**. New York: Blackwell Scientific, 1978.

GOSTOMSKI, Frank. The toxicity of aluminum to aquatic species in the US. **Environmental geochemistry and health**, v. 12, n. 1, p. 51-54, 1990.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

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, 2020.

GRANGEIRO, L. C. et al. Crescimento e acúmulo de nutrientes em coentro e rúcula. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2011.

GRIPP, H. S. et al. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 173–179, 2017.

GUERRERO, A. C.; BORGES, L. S.; FERNANDES, D. M. Desenvolvimento de rúcula em dois solos com doses de silício, 2008. Disponível em: http://www.diadecampo.com.br/arquivos/materias/%7BEAA46596-ED0E-45B8-B414-3903E238665E%7D_62_2.pdf. Acesso em maio/2022.

GUNASEKARA, A. S. et al. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, p. 189 - 199, 2007.

HAGE, D. S.; CARR, J. D. **Química analítica e análise quantitativa**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2012. p. 101–103.

HARIDASAN, M. Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado? *Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral*. Editora Manole, Barueri, SP, p. 466, 2006.

HOODA, P. S. et al. A review of water quality concerns in livestock farming areas. **Science of the total environment**, v. 250, n. 1-3, p. 143-167, 2000.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; OLIVEIRA JUNIOR, G. J. Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v. 5, n. 1, p. 83-90, 2016.

HYNE, R. V. et al. Influence of water chemistry on the acute toxicity of copper and zinc to the cladoceran *Ceriodaphnia cf dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 24, n. 7, p. 1667-1675, 2005.

HULL, V.; PARRELLA, L.; FALCUCCI, M. Modelling dissolved oxygen dynamics in coastal lagoons. **Ecological Modelling**, v. 211, n. 3-4, p. 468-480, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Boletim anual de produção, importação, exploração e vendas de**

agrotóxicos no Brasil. 2021. Disponível em:

<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 28 jun. 2022.

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

JAK, R. G.; MAAS, J. L.; SCHOLTEN, M. C. Th. Evaluation of laboratory derived toxic effect concentrations of a mixture of metals by testing fresh water plankton communities in enclosures. **Water Research**, v. 30, n. 5, p. 1215-1227, 1996.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **Extract and visualize the results of multivariate data analyses.** 2020.

Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/readme/README.html>. Acesso em: 20 jul. 2020.

KAUFMANN, V.; PINHEIRO, A.; CASTRO, N. M. R. Transporte de compostos de carbono, nitrogênio e fósforo pelo escoamento da água em solos agrícolas na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 19, n. 1, p. 75-86, 2014.

KOETZ, M. et al. Rúcula submetida a doses de fósforo em Latossolo Vermelho do cerrado. *Enciclopédia Biosfera*, v. 8, n. 15, 2012.

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, n. 114417, 2022.

KORNDÖRFER, G. H. Elementos benéficos. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. 432p.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSOHOF, K.; KREMLING, K.; EHRHARDT, M. (ed). **Methods of seawater analysis**. Weinheim: Wiley-VCH, 1976. P. 117-181.

KUHLMANN, M. L.; HAYASHIDA, C. Y.; ARAÚJO, R. P. A. Using *Chironomus* (Chironomidae: Diptera) mentum deformities in environmental assessment. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 12, p. 55–61, jan. 2000.

LAMPARELLI, M. C. Grau de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento. São Paulo: USP/ Departamento de Ecologia., 2004. 235 f. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2004.

LANGE, A. et al. Degradação do solo e pecuária extensiva no norte de Mato Grosso. **Nativa**, v. 7, n. 6, p. 642-648, 2019.

LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. **Journal of statistical software**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2008.

- LI, K. et al. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 171, p. 40-48, 2017.
- LI, X. et al. Development of precise GC-EI-MS method to determine the residual fipronil and its metabolites in chicken egg. **Food chemistry**, v. 281, p. 85-90, 2019.
- LI, Y. et al. Variation of dissolved nutrient exports by surface runoff from sugarcane watershed is controlled by fertilizer application and ground cover. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 303, Nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107121>.
- LIBER, K. et al. Effects of *Chironomus tentans* larval growth retardation on adult emergence and ovipositing success: implications for interpreting freshwater sediment bioassays. **Hydrobiologia**, v. 323, n. 3, p. 155–167, May 1996.
- LIN, K. et al. Persistence and sorption of fipronil degradates in urban stream sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry: an international journal**, v. 28, n. 7, p. 1462-1468, 2009.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.
- LOPES, L. F. P. et al. Evaluation of the effect of antimicrobials in marine cultures, using the copepod *Acartia tonsa* as a bioindicator. **Chemistry and Ecology**, v. 34, n. 8, p. 747-761, 2018.
- LORA, B. A. et al. Levantamento georreferenciado da expansão da cultura de cana-de-açúcar no estado de São Paulo. São Paulo: CENBIO; IEE/USP, 2006.
- MACDONALD, K. A. et al. Production and economic responses to intensification of pasture-based dairy production systems. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6602-6619, 2017.
- MACKERETH, H. F. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. F. **Water analysis: some revised methods for limnologists**. Cúmbria: Freshwater Biological Association Scientific, 1978.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.
- MAGALHÃES, D. V. Produção de rúcula em função de diferentes dosagens de fósforo. **Ipê Agronomic Journal**, v. 3, n. 2, p.70-76, 2019.
- MAGNOLI, K. et al. Herbicides based on 2, 4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 31, p. 38501-38512, 2020.

- MANSANO, A. S. et al. Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Environ Sci Pollut Res Int* 25:13335–13346, 2018.
- MAPBIOMAS. A evolução da pastagem nos últimos 36 anos. MapBiomas Coleção 6. 2021. Disponível em: <https://mapbiomas.org/pastagens-brasileiras-ocupam-area-equivalente-a-todo-o-estado-do-amazonas>. Acesso em maio/2022.
- MARCATO, A. C. C.; SOUZA, C. P.; FONTANETTI, C. S. Herbicide 2, 4-D: a review of toxicity on non-target organisms. **Water Air Soil Pollution**, v. 228, Mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3301-0>.
- MARCHESAN, E. et al. Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. **Scientia Agricola**, v. 64, p. 2, p. 131-137, 2007.
- MARCHESAN, E. et al. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1053-1059, 2010.
- 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.
- MARTINELLI, L. A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: Environmental and social challenges. **Ecological Applications**, v. 18, n. 4, p. 885–898, 2008.
- MARTINEZ, E. A. et al. Induction of morphological deformities in *Chironomus tentans* exposed to zinc-and lead-spiked sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 20, n. 11, p. 2475-2481, 2001.
- MARTINEZ, E. A. et al. Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium—and copper-spiked sediments. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 55, n. 2, p. 204-212, 2003.
- MARTÍNEZ-RUIZ, E. B.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Exposure to the herbicide 2,4-D produces different toxic effects in two different phytoplankters: a green microalga (*Ankistrodesmus falcatus*) and a toxigenic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). **Science of the Total Environment**, v. 619–620, p. 1566–1578, 2018.
- MARTINI, L. F. D. et al. Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, p. 1715-1721, 2012.
- MARTINS, R. T.; OLIVEIRA, V. C.; SALCEDO, A. K. M. Uso de insetos aquáticos na avaliação de impactos antrópicos em ecossistemas aquáticos. *In*: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, R. B. **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Manaus: INPA, 2014. Cap. 7, p. 117-128.

MAZZI, E. Fotos aéreas das unidades de tratamento (esquerda) e mesocosmo (direita) na fazenda experimental de Brotas-SP. 2019.

MCDOWELL, R.; TRUDGILL, S. Variation of phosphorus loss from a small Catchment in South Devon, UK. *Agriculture Ecosystems & Environment*, v. 79, n. 2/3, p. 143-157, July 2000.

MELO, M. C. R. **Políticas públicas brasileiras de biocombustíveis**: estudo comparativo entre os programas de incentivos à produção, com ênfase em etanol e biodiesel. 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

MILHOME, M. A. L. et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, p. 363-372, 2009.

MONTEIRO, H. R. et al. Assessment of fipronil toxicity to the freshwater midge *Chironomus riparius*: molecular, biochemical, and organismal responses. **Aquatic Toxicology**, v. 216, Nov. 2019. DOI: 10.1016/j.aquatox.2019.105292.

MOREIRA, L. E. B. et al. Análise ecotoxicológica em viveiro de carcinicultura de água doce, utilizando o cladóceros *Ceriodaphnia dubia* como organismo-teste. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 1, p. 25-38, 2018.

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, 2020.

MOUNT, D. I.; NORBERG, U. T. J. A seven-day life cycle cladoceran toxicity test. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 3, n. 3, p. 425-434, 1984.

NEGRO, C. L. et al. Cost of reproduction changes in metabolism and endosulfan lethality caused by reproductive behavior in *Hyalella curvispina* (Crustacea: Amphipoda). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 121–127, 2013.

NELSON, S. M.; ROLINE, R. A. Evaluation of the sensitivity of rapid toxicity tests relative to daphnid acute lethality tests. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 60, n. 2, p. 292-299, 1998.

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, 2022a.

OGURA, A. P. et al. Irrigation with Water Contaminated by Sugarcane Pesticides and Vinasse Can Inhibit Seed Germination and Crops Initial Growth. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 3, p. 330-340, 2022b.

ODUM, H. T. **Systems ecology**: an introduction. New York: John Wiley, 1983.

OLAYEMI, O.P; KALLENBACH, C.M.; WALLENSTEIN, M.D. Distribution of soil organic matter fractions are altered with soil priming. **Soil Biol. Biochem.**, v. 164, Article 108494, 2022.

OLIVEIRA, E. F.; GOULART, E. Distribuição espacial de peixes em ambientes lênticos: interação de fatores. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 22, p. 445-453, 2000.

OLIVEIRA, T. S. et al. Avaliação da degradação de pasto nativo embasada em parâmetros de solo. **Diversitas Journal**, v. 6, n. 2, p. 1871-1885, 2021.

OZOE, Y. et al. Multiple sites of insecticidal action in ionotropic GABA receptors. In: Discovery and Synthesis of Crop Protection Products. **American Chemical Society**, p. 431-446, 2015.

PATTANASUPONG, A. et al. Ability of a microbial consortium to remove pesticide carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 517-522, July 2004.

PEDRO, J. **Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste Allium cepa**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2008.

PEREIRA, C.A.F. et al. Seasonal variations, metal distribution and water quality in the Todos os Santos River, Southeastern Brazil: a multivariate analysis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, p. 2701-2710, 2018.

PERET, A. M. et al. Dynamics of fipronil in Óleo lagoon in Jataí ecological station, São Paulo-Brazil. **Chemosphere**, v. 78, n. 10, p. 1225–1229, 2010.

PÉREZ-LEGASPI, I. A, et al. Evaluación de la sensibilidad del cladóceros tropical *Ceriodaphnia cornuta* a metales pesados. **Revista internacional de contaminación ambiental**, v. 33, n. 1, p. 49-56, 2017.

PÉRY, A. R. R. et al. A Modelling approach to link food availability, growth, emergence and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 2507–2513, 2002.

PESTANA, J. L. T. et al. Pesticide exposure and inducible antipredator responses in the zooplankton grazer, *Daphnia magna* Straus. **Chemosphere**, v. 78, p. 241–248, 2010.

PIASAROLO, L.; RIGITANO, R. L. O.; GUERREIRO, M. C. Influência da polaridade de pesticidas não-iônicos sobre sua sorção em um latossolo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1802-1809, 2008.

- PINTO, T. J. et al. Impact of 2, 4-D and fipronil on the tropical midge *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/ecoenv.2020.111778>.
- PRADO, R. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2013, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/581984>.
- PRÓSPERI, V. A. **Comparação de métodos ecotoxicológicos na avaliação de sedimentos marinhos e estuarinos**. 2002. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- QURRATU, A.; REEHAN, A. A Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) derivatives: 2,4-D dimethylamine salt and 2,4-D butyl ester. **International Journal of Applied Engineering Research**, v. 11, n. 19, p. 9946–9955, Jan. 2016.
- RAMOS, T. A. B. **Sistemas de indicadores e índices de qualidade da água e sedimento em zonas costeiras**. 1996. Tese (Doutorado) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 1996.
- RAO, C. R. Linear statistical inference and its applications, Second edition. Wiley, New York, New York, USA, 1973.
- RAO, P. S. C.; WAGENET, R. J. Spatial variability of pesticides in field soils: methods for data analysis and consequences. **Weed Science**, v. 33, p.18-24, 1985. Suppl. 2.
- REKOLAINEN, S. et al. Off-Site Impacts of Erosion: Eutrophication as an Example. **Soil Erosion in Europe**, p.775- 789, 2006.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2020.
- RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n.7, p. 1360-1362, 2014.
- RODGHER, S. et al. Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tietê River (São Paulo, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n.4, p. 697-710, 2005.
- ROSA, R. et al. Eficiência nutricional na produção de mudas de maracujazeiro azedo em função das concentrações de fósforo em solução nutritiva. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, 2021.
- RUIZ DE ARCAUTE, C.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 222–229, 2016.

SABA, E. D. **Avaliação da qualidade das águas subterrâneas dos cemitérios de Brasília e seu entorno**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

SANTOS, M. L. S. et al. Estudo das diferentes formas de fósforo nas águas da plataforma continental do Amazonas. **Química Nova**, v. 30, p. 569-573, 2007.

SANTOS, I. B. et al. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 142-149, 2012.

SERAFIM, R. F. et al. Efeitos da aplicação de vinhaça na fertilidade do solo. **Irriga**, v. 26, n. 2, p. 439-459, 2021.

SCHERER, C et al. Toxicity of microplastics and natural particles in the freshwater dipteran *Chironomus riparius*: Same same but different?. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134604, 2020.

SIBLEY, P. K.; BENOIT, D. A.; ANKLEY, G. T. The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: relationship to reproduction and demographic endpoints. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 336–345, 1997.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108–114, 2007.

SILVA, J. M.; SANTOS, J. R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 4, p. 565–573, 2007.

SILVA, D. D. F. et al. Análise de nitrato e amônio em solo e água. Embrapa Milho e Sorgo- Documentos (INFOTECA-E), 2010.

SILVA, J. M.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B. Aplicação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente com microdetector de captura de elétrons para determinação de agrotóxicos em sedimentos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 962-967, 2011.

SILVA-DE-SÁ, R. J.; SOUZA, A. G. S.; JESUS, E. S.; JÚNIOR, A. P. Indicadores biológicos de qualidade da água e as mudanças climáticas Biological indicators of water quality and climate changes. **Multidisciplinary Reviews**, Lisboa, v. 2, n. 1, p. 3-9, 2019.

SMEETS, E. et al. The Sustainability of Brazilian ethanol—an assessment of the possibilities of certified production. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 8, p. 781–813, 2008.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 131-143, 2007.

SOLOMON, K. R.; HANSON, M. Mesocosms and microcosms (aquatic). *In: ENCYCLOPEDIA of toxicology*. 3rded. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00568-6>.

SOLONESKI, S.; NIKOLOFF, N.; LARRAMENDY, M.L. Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulations: Endo III and Fpg alkaline comet assays in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 797, p. 46–52, Feb. 2016.

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

SOTO, M. A.; BASSO, J. B.; KIANG, C.H. Impacto da fertirrigação da cana-de-açúcar por vinhaça nas propriedades físicas, químicas e hidráulicas do solo. *In: FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Org.). Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica*. Bauru: Canal 6, 2017.

SOUZA, J. S. et al. Aplicação das concentrações e proporções de nutrientes no diagnóstico da eutrofização. 2014. **VÉRTICES**, v.16, n.1, p. 199-218, 2014.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista do Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, p. 1-9, maio 2006. Trabalhos apresentado na 4ª Jornada Jurídica da Faculdade Marechal Robdon, 2006, São Manuel.

STEFFENS, C. et al. Water quality assessment of the Sinos River–RS, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 62-67, 2015.

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, 1998.

TARANU, Z. E.; GREGORY-EAVES, I. Quantifying relationships among phosphorus, agriculture, and lake depth at an inter-regional scale. **Ecosystems**, v. 11, n. 5, p. 715-725, 2008.

TARAZONA, J. V.; RAMOS-PERALONSO, M. J. Ecotoxicology. *In: ENCYCLOPEDIA of toxicology*. 3rded. v. 2, p. 276-280, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00494-2>.

TETZNER, N. F. et al. On-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a powerful technique for the determination of sulfonamide residues in soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1452, p. 89-97, 2016.

TINGLE, C. C. D. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 176, p. 1-66, 2003.

TOFFOLI, A. L. **Fipronil e produtos de degradação**: adaptação de método analítico e caracterização de amostras de água, solo e sedimento da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande. 2014. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2014.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. *Limnologia*. São Paulo: Oficina de textos, 2016.

TURETTA, A. P. D. et al. A Framework proposal for sustainability assessment of sugarcane in Brazil. **Land Use Policy**, v. 68, p. 597–603, Aug. 2017.

UDEIGWE, T. K. et al. Application, chemistry, and environmental implications of contaminant-immobilization amendments on agricultural soil and water quality. **Environment International**, v. 37, n. 1, p. 258-267, Jan. 2010.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Unicadata**. 2015. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br>. Acesso em: 10 jul. 2019.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological effects test guidelines, OPPTS 850.4200, seed germination/root elongation toxicity test**. Washington, 1996a. EPA 712-C-96-154. Prevention, Pesticides and Toxic Substances.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **New Pesticide Fact Sheet, PB96e181516**. Washington, 1996b. EPA737-F- 96-005. Prevention, Pesticides and Toxic Substances.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Environmental data and effects division’s risk assessment for the reregistration eligibility document for 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)**. Washington, 2004.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Reregistration eligibility decision for 2,4-D**. Washington, 2005. EPA 738-R-05-002.

VEGA, M. et al. Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. **Water research**, v. 32, n. 12, p. 3581-3592, 1998.

VERSONNEN, B.; SOBANSKA, M.; CESNAITIS, R. *Ecotoxicology, Aquatic*. 2014.

VIEGAS, M.; RAMOS, M. J.; FERNANDES, P. A. Biocombustíveis, serão a solução? **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 2, jun. 2018.
DOI: <https://doi.org/10.249227/rce2018.43>.

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.

WHITEHEAD, D. C. *Grassland nitrogen*. Wallingford: CAB International, 397 p, 1990.

- WIJEWARDENE, L. et al. Influences of pesticides, nutrients, and local environmental variables on phytoplankton communities in lentic small water bodies in a German lowland agricultural area. **Science of the Total Environment**, v. 780, Aug. 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146481.
- WOMAC, A. R.; GOODWIN, J. C.; HART, W. E. Comprehensive evaluation of droplet spectra from drift reduction nozzles. ASAE, 1997.
- WONG, P. K. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. **Chemosphere**, v. 41, n. 1–2, p. 177–182, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification**: 2009. Geneva: WHO, 2010.
- 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.
- XU, H. et al. Fipronil-induced toxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) larvae by using digital gene expression profiling. **Science of the Total Environment**, v. 639, p. 550-559, 2018.
- YOUNOS, T. M.; WEIGMANN, D. L. Pesticides: a continuing dilemma. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, v. 60, n. 7, p. 1199-1205, 1988.
- ZATTA, P.; LAIN, E.; CAGNOLINI, C. Effects of aluminum on activity of Krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 10, p. 3049-3055, 2000.
- ZEILHOFER, P.; LIMA, E. B. N. R.; LIMA, G. A. R. Spatial patterns of water quality in the Cuiabá River Basin, Central Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 123, n. 1, p. 41-62, 2006.
- ZHAO, Y.; NEWMAN, M. C. Ecotoxicology, Aquatic. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of toxicology**. 2nded. New York: Academic Press, 2005. p. 120–121.
- ZHU, X. et al. Herbicides interfere with antigrazer defenses in *Scenedesmus obliquus*. **Chemosphere**, v. 162, p. 243–251, 2016.

