

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
ENGENHARIA AMBIENTAL

DANILLO BADOLATO ATHAYDE

**Análise da toxicidade dos agrotóxicos abamectina e difenoconazol, isolados e em mistura, em *Daphnia similis*, sob a influência de diferentes condições de temperatura**

São Carlos  
2020



DANILLO BADOLATO ATHAYDE

**Análise da toxicidade dos agrotóxicos abamectina e difenoconazol, isolados e em mistura, em *Daphnia similis*, sob a influência de diferentes condições de temperatura**

Monografia apresentada ao curso de graduação em Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo

Orientadora: Dra. Lívia Pitombeira de Figueirêdo

São Carlos

2020



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

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

A183a Athayde, Danillo Badolato  
Análise da toxicidade dos agrotóxicos abamectina  
e difenoconazol, isolados e em mistura, em *Daphnia*  
*similis*, sob a influência de diferentes condições de  
temperatura / Danillo Badolato Athayde; orientador  
Lívia Pitombeira de Figueirêdo. São Carlos, 2020.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --  
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de  
São Paulo, 2020.

1. Agrotóxicos. 2. Águas subterrâneas. 3.  
Mesocosmos. 4. Abamectina. 5. Difenoconazol. 6. *Daphnia*  
*similis*. 7. Toxicidade aguda. 8. Ecotoxicologia  
aquática. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907



# FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Danillo Badolato Athayde**

Data da Defesa: 30/11/2020

Comissão Julgadora:

*Lívia Pitombeira de Figueirêdo (Orientador(a))*

*Clarice Maria Rispoli Botta*

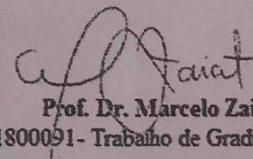
*Raquel Aparecida Moreira*

Resultado:

Aprovado

Aprovado

Aprovado

  
Prof. Dr. Marcelo Zaiat  
Coordenador da Disciplina 1800091 - Trabalho de Graduação



## AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo suporte, paciência e compartilhamento de momentos de descontração, incluindo aguentar ocasionais demonstrações de teimosia e elaboração de teorias sobre assuntos irrelevantes.

À minha companheira Natalia, pela eficiência em não me deixar desistir, às vezes sob um tom extremamente ameaçador, por ouvir meus discursos verborrágicos durante a noite, e por não me jogar pela janela em episódios de mau humor matinal.

À minha orientadora, Dra. Lívia Pitombeira, por frequentemente me fazer esquecer o meu nome verdadeiro, por compartilhar noites mal dormidas durante as semanas de experimento, por me fazer emergir nesse universo da ciência, por me incentivar nas realizações científicas e pessoais, por responder (aos risos) meus questionamentos sobre assuntos aleatórios envolvendo a paisagem e principalmente pelo apoio em momentos de angústia e incerteza, me ajudando a entregar o melhor resultado possível.

Ao meu orientador do projeto da FAPESP, Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, pelas grandes oportunidades que me proporcionou, por me apresentar a Ecotoxicologia, pela grande didática, até mesmo nos puxões de orelha, pelo comprometimento e por tornar esse trabalho possível.

Aos membros da banca, Dra. Clarice Maria Rispoli Botta e a Dra. Raquel Aparecida Moreira, pela disponibilidade e contribuição ao trabalho.

Aos meus colegas de NEEA, Allan, André, Cauê, Covinha, Diego, Edna, Juliane, Laís, Maria Paula, Marina, Max, Obede, Thandy e Vanessa, por toda força física e intelectual que tornou possível esse trabalho, pelo compartilhamento de risos durante os dias de trabalho árduo, por me permitirem fazer parte desse time e pelos ensinamentos.

Aos técnicos do NEEA, Marcelo e Amândio, pela ajuda na realização das diversas várias análises que o trabalho demandou e por compartilharem um pouco de seus conhecimentos adquiridos ao longo dos anos.

Aos meus amigos do Banana, pelas conversas totalmente descompromissadas com o sentido, pela audácia e pela amizade.

À Universidade de São Paulo, por fazer esse sonho possível.

À FAPESP, pelo financiamento do desenvolvimento do meu projeto de pesquisa (Processo 2016/07214-4), ao qual este trabalho está vinculado.



“É um erro acreditar que é possível resolver qualquer problema importante usando batatas.”

Douglas Adams



## RESUMO

ATHAYDE, D. B. **Análise da toxicidade dos agrotóxicos abamectina e difenoconazol, isolados e em mistura, em *Daphnia similis*, sob a influência de diferentes condições de temperatura.** 2020. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Os agrotóxicos, por meio da atuação de ingredientes ativos, agem no controle de espécies, doenças e plantas que tem impacto econômico na produção agrícola. No entanto, também agem sobre organismos não-alvo, podendo afetar dessa forma, a estrutura e funcionamento dos ecossistemas. Por meio da chuva e processos como lixiviação e escoamento superficial, os agrotóxicos podem atingir corpos hídricos tornando vulneráveis os ecossistemas aquáticos associados. Motivada pelas perspectivas para o uso de agrotóxicos no Brasil, somadas à necessidade de trabalhos que façam uso de uma abordagem ecotoxicológica integrando ambientes aquáticos e terrestres, a presente pesquisa buscou avaliar a toxicidade dos inseticida Kraft 36 EC® (ingrediente ativo abamectina) e fungicida Score 250 EC® (i.a. difenoconazol), levando em consideração a influência da temperatura (temperatura controlada de 23 e 33°C e condições naturais, em período chuvoso brasileiro) e o processo de lixiviação. Para isso, foram utilizados simuladores solo-água, do tipo mesocosmos, preenchidos com solo proveniente do município de Itirapina-SP, sendo realizadas simulações de chuvas e aplicações de agrotóxicos semanais. Os mesocosmos controles foram pulverizados apenas com água e aqueles reservados para a simulação da aplicação dos agrotóxicos foram pulverizados com solução referente ao recomendado pelos fabricantes para a cultura de morango, sendo 10,8 g i.a./ha para o Kraft 36 EC® e 20,0 i.a./ha para o Score 250 EC®, aplicados isoladamente ou em misturas. Os experimentos duraram três semanas e, em cada uma delas, no seu 1º dia realizou-se simulação de chuvas seguida da aplicação dos agrotóxicos e no 4º dia apenas simulação de chuvas. Com o percolado resultante de cada um dos mesocosmos foram feitos ensaios de toxicidade aguda com a espécie *Daphnia similis* (Cladocera), sendo organismo-teste representativo das comunidades aquáticas. Os resultados indicaram que nos experimentos de temperatura controlada de 23°C, o percolado dos mesocosmos tratados com Kraft®, inclusive quando aplicado em mistura, se mostrou tóxico, ocasionando a imobilização dos organismos-teste na maior parte dos dias, enquanto que o percolado relativo ao Score® não indicou toxicidade, não apresentando diferença significativa em relação aos mesocosmos controles. Já sob a temperatura controlada de 33°C, a partir do dia 4 do experimento, tanto o percolado com Kraft® quanto o com Score® não indicaram efeitos tóxicos aos organismos teste. Por fim, sob condições ambientais naturais, em que ocorreu alta amplitude térmica, exposição de luz solar e eventuais precipitações naturais, os resultados se aproximaram das condições encontradas sob temperatura controlada de 33°C, em que após o dia 3 de experimentos os percolados dos mesocosmos não apresentaram toxicidade.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Águas subterrâneas. Mesocosmos. Abamectina. Difenoconazol. *Daphnia similis*. Toxicidade aguda. Ecotoxicologia aquática.

## ABSTRACT

**ATHAYDE, D. B Toxicity analysis of pesticides abamectin and difenoconazole, isolated and in mixture, in the aquatic organism *Daphnia similis*, under the influence of different conditions of temperature.** 2020. Monography (Final Paper) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Pesticides, through the use of active ingredients, act to control species, diseases and plants that have an economic impact on agricultural production. However, they also affect on non-target organisms, thus affecting the structure and the functioning of ecosystems. Through rain and processes such as leaching and runoff, pesticides can reach water bodies making the associated aquatic ecosystems vulnerable. Motivated by the prospects of the use of pesticides in Brazil, added to the need for studies that use an ecotoxicological approach integrating aquatic and terrestrial environments, the present research sought to evaluate the toxicity of the insecticide Kraft 36 EC® (active ingredient abamectin) and fungicide Score 250 EC® (ia diphenoconazole), taking into account the influence of temperature (controlled temperature of 23 and 33°C and natural conditions, in the Brazilian rainy season) and the leaching process. For this, soil-water simulators (mesocosms) were filled with soil from the municipality of Itirapina-SP, with rain simulations and weekly pesticide applications being carried out. The control mesocosms were sprayed only with water and those reserved for the simulation of the application of pesticides were sprayed with a solution referring to that recommended by the manufacturers for the strawberry crop, 10.8 g a.i. / ha for Kraft 36 EC® and 20.0 a.i. / ha for Score 250 EC®, applied alone or combined. The experiments lasted three weeks and, in each of them, on the 1st day rain simulation was performed followed by the application of pesticides and on the 4th day only rain simulation. With the percolate resulting from each of the mesocosms, acute toxicity tests were carried out with the species *Daphnia similis* (Cladocera), being a test organism representative of aquatic communities. The results indicated that in the controlled temperature experiments of 23°C, the percolate of the mesocosms treated with Kraft®, even when applied in mixture, proved to be toxic, causing the immobilization of the test organisms in most days, while the percolate relative to the Score® did not indicate toxicity, showing no significant difference in relation to the control mesocosms. Already under the controlled temperature of 33°C, from day 4 of the experiment, both percolated with Kraft® and with Score® did not indicate toxic effects to the test organisms. Finally, under natural environmental conditions, in which there was large thermal amplitude, exposure to sunlight and possible natural precipitations, the results were similar to the conditions found under controlled temperature of 33°C, where after day 3 of experiments, the percolates of the mesocosms did not showed toxicity.

**Keywords:** Pesticides. Groundwater. Abamectin. Difenoconazole. Mesocosms. *Daphnia similis*. Acute toxicity. Aquatic ecotoxicology.



## Lista de Figuras

Figura 1.1: Número de registro de agrotóxicos e afins registrados anualmente, entre 2012 e 2019 .....	2
Figura 4.1: Mesocosmos montados para a coleta de água.....	13
Figura 4.2: Procedimento de montagem dos simuladores, com detalhe para a parte interna dos mesmos, com a peneira e cascalho. ....	13
Figura 4.3: Coleta do solo nas dependências do CRHEA .....	14
Figura 4.4: Armazenamento do solo em caixas d'água .....	14
Figura 4.5: Detalhe da peneira utilizada no peneiramento do solo .....	15
Figura 4.6: Realização do peneiramento do solo.....	15
Figura 4.7: Moldes para abertura dos buracos destinados às sementes .....	16
Figura 4.8: Design do experimento sob temperatura controlada.....	17
Figura 4.9: Design do Experimente sob condições ambientais naturais .....	18
Figura 5.1: Curva de distribuição granulométrica do solo .....	24
Figura 5.2: Valores de pH (média ± desvio padrão) obtidos nas amostras de água percolada à 23°C (A), 33°C (B) e condições ambientais (C), após cada simulação da chuva.....	25
Figura 5.3: Variação dos valores de sólidos dissolvidos (média ± desvio padrão) nas amostras de água percolada nos simuladores ao longo do experimento à 23°C (A), 33°C (B) e sob condições ambientais (C).....	26
Figura 5.5: Concentração de oxigênio dissolvido em mg/L (média ± desvio padrão), dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambientais (C). .....	26
Figura 5.8: Nitrogênio total presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambientais(C) .....	28
Figura 5.9: Nitrogênio amoniacal nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambiente(C).....	28
Figura 5.10: Nitrogênio na forma de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambiente(C) .....	28
Figura 5.11: Nitrogênio na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambiente(C) .....	29
Figura 5.12: Fósforo total (Pt) presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambiente (C) .....	29
Figura 5.13: Fósforo total dissolvido (PTD) presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A) e à 33°C (B) e sob condições ambiente (C) .....	29

Figura 5.14: Fosfato inorgânico (POi) presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A) e à 33°C (B) e sob condições ambiente (C).....	30
Figura 5.15: Resultados do teste de sensibilidade de <i>Daphnia similis</i> ao cloreto de potássio em mg/L para a Concentração Efetiva na Imobilidade de 50% dos organismos – CE50 (média ± desvio padrão) .....	32
Figura 5.16: Resultados do teste de sensibilidade de <i>Daphnia similis</i> ao cloreto de potássio em mg/L para a Concentração Efetiva na Imobilidade de 50% dos organismos – CE50 (média ± desvio padrão) .....	32
Figura 5.17: Pencetais de imobilidade (média ± desvio padrão) de <i>D. similis</i> em resposta aos percolados produzidos nos mesocosmos tratados com os agrotóxicos Kraft (K), Score (S) e a mistura deles (K+S) em relação ao controle (C) à 23°C.....	34
Figura 5.18: Temperaturas, em °C, registradas durante o período de experimentos em condição ambiente, do dia 16 de Janeiro (Dia 1) ao dia 2 de Fevereiro (Dia 18) .....	36
Figura 5.19: Precipitações, em mm, registradas durante o período de experimentos em condição ambiente, do dia 16 de Janeiro (Dia 1) ao dia 2 de Fevereiro (Dia 18) .....	37
Figura 5.20: Intensidade luminosa, em lux, registrada durante o período de experimentos em condição ambiente, do dia 16 de Janeiro (Dia 1) ao dia 2 de Fevereiro (Dia 18). .....	37

## **Lista de Tabelas**

Tabela 4.3. Metodologias e referências utilizadas nas análises das variáveis químicas da água e solo (em negrito as variáveis já quantificadas até o presente momento).....	19
Tabela 5.1: Concentração nominal e real dos princípios ativos dos produtos (mg/L) .....	21
Tabela 5.2. Classificação da água em função dos valores de dureza. .....	25
Tabela 5.3: Valores de dureza obtidos após simulação da chuva nos simuladores.....	25
Tabela 5.5: Pencetuais de imobilidade (média ± desvio padrão) de <i>D. similis</i> em resposta aos percolados produzidos nos mesocosmos tratados com os agrotóxicos Kraft (K), Score (S) e a mistura deles (K+S) em relação ao controle (C) à 33°C.....	35
Tabela 5.6: Pencetuais de imobilidade (média ± desvio padrão) de <i>D. similis</i> em resposta aos percolados produzidos nos mesocosmos tratados com os agrotóxicos Kraft (K), Score (S) e a mistura deles (K+S) em relação ao controle (C) à condições ambientais naturais.....	38

## Lista De Abreviaturas E Siglas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
C	Mesocosmos controle
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva Mediana
CENO	Concentração de Efeito Não-observado
CL <sub>50</sub>	Concentração Responsável por Mortalidade de 50% da população
CRHEA	Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
ISO	International Organization for Standardization
K	Agrotóxico Kraft
K + S	Agrotóxicos Kraft e Score
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Mistério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NEEA	Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Nitrogênio amoniacal
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
N <sub>t</sub>	Nitrogênio Total
OD	Oxigênio Dissolvido
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Policloreto de Vinila
POi	Fosfato Inorgânico
P <sub>T</sub>	Fósforo Total
PTD	Fósforo Total Dissolvido
S	Agrotóxico Score
TDS	Sólidos Dissolvidos Totais
USP	Universidade de São Paulo
VTD	Variações Diárias de Temperatura

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>5</b>
2.1	Objetivos específicos .....	5
<b>3</b>	<b>Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>7</b>
3.1	Toxicidade de agrotóxicos e a influência da temperatura .....	7
3.2	Agrotóxicos utilizados no estudo: Kraft 36 EC® e Score® 250 EC.....	9
3.3	Sistemas solo-água .....	10
3.4	Ensaios de toxicidade .....	11
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>13</b>
4.1	Experimentos em mesocosmos.....	13
4.2	Dados climatológicos .....	18
4.3	Testes de toxicidade com organismos aquáticos .....	18
4.4	Análises físicas e químicas das amostras de solo e água.....	19
4.5	Análise de Dados .....	20
<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>21</b>
5.1	Determinação dos princípios ativos nos produtos comerciais .....	21
5.2	Caracterização do solo utilizado nos ensaios .....	22
5.3	Parâmetros físico-químicos da água percolada durante as simulações ao longo do tempo .....	24
5.4	Nutrientes presentes na água percolada durante as simulações ao longo do tempo .....	27
5.5	Testes de toxicidade.....	31
5.6	Experimentos em mesocosmos.....	33
5.6.1	Condições de temperatura controlada.....	33
5.6.2	Experimentos sob condições ambientais naturais.....	35
5.6.3	A toxicidade do Kraft® e Score® e a influência da temperatura .....	38
<b>6</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>43</b>
	<b>Referências .....</b>	<b>45</b>





## 1 Introdução

A partir da década de 60, as transformações na agricultura brasileira foram profundas tanto nos aspectos tecnológicos quanto sociais. A adoção de um padrão moderno para a agricultura brasileira e a expansão do crédito rural buscava torná-la forte e competitiva, obtendo autossuficiência alimentar e consolidando o país como grande exportador de matérias-primas agrícolas (LUZZI, 2007; SOUSA et al., 2020). Este foi o início da chamada “Revolução Verde” que implicou em um aumento considerável da produtividade agrícola por meio do pacote tecnológico que incluía o uso de fertilizantes sintéticos, mecanização agrícola, de irrigação intensiva e de agrotóxicos (CARVALHO; NODARI; NODARI, 2017; SOARES; PORTO, 2009;).

A Lei Federal 7.802/89, que foi instituída para regulação de agrotóxicos, os define como sendo:

Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos [...] (BRASIL, 1989).

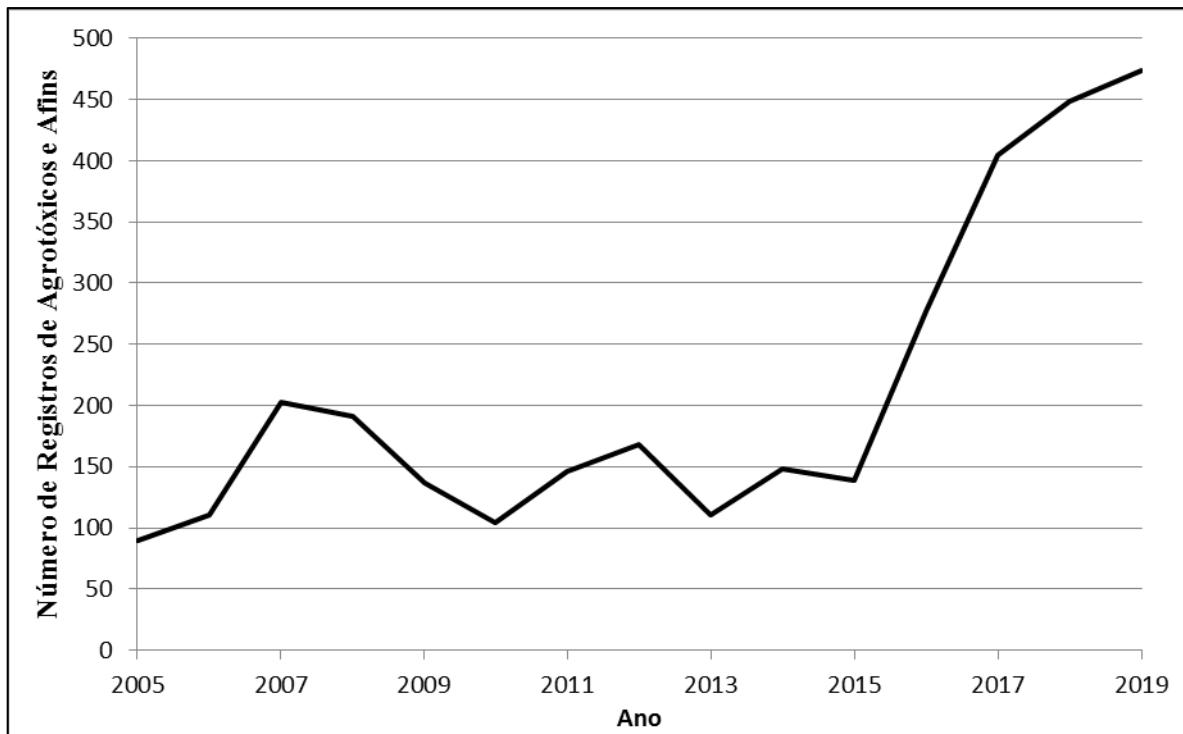
Os agrotóxicos, por meio da atuação de ingredientes ativos, agem no controle de espécies, doenças e plantas que tem impacto econômico na produção agrícola

A despeito da alta eficácia em reduzir impactos econômicos negativos na produção agrícola ocasionados por espécies consideradas pragas ou daninhas, como insetos, fungos, plantas, dentre outros, os agrotóxicos oferecem riscos à saúde humana, por meio da exposição ocupacional, como ocorre com agricultores, durante o transporte, manipulação e preparo dos produtos utilizados, e por meio da exposição ao meio ambiente, atingindo corpos hídricos utilizados para consumo e contaminando alimentos, podendo causar alterações sobre o metabolismo de seres humanos, e de quaisquer outros organismos não alvo que interajam com esses recursos, como outros vertebrados, invertebrados e microrganismos, impactando na dinâmica ecológica (CARNIEL et al., 2019; DUSO; VAN LEEUWEN; POZZEBON, 2020; ITURBURU et al., 2019). O uso muitas vezes indiscriminado e incorreto, frequentemente ocasionado pela falta de instrução do agricultor, pode ocasionar contaminação dos solos

agrícolas, das águas superficiais e subterrâneas, além dos alimentos. Portanto, além dos trabalhadores e produtores rurais estarem expostos, outras pessoas, como também organismos terrestres e aquáticos podem sofrer efeitos negativos mediante a exposição direta e indireta a esses compostos (SHARMA et al., 2020; SPADOTTO et al., 2010).

Ao se analisar o panorama brasileiro, os dados divulgados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) sobre as vendas anuais de agrotóxicos e afins entre os anos de 2010 e 2018, revelam um aumento de 43% na comercialização de ingredientes ativos, molécula efetiva de ação do produto, atingindo 54.9280,44 toneladas. Com relação à comercialização dos ingredientes ativos dos agrotóxicos estudados no presente trabalho, a abamectina e o difenoconazol, entre 2015 e 2018 apresentaram um aumento de 41% e 175%, respectivamente (IBAMA, 2020). Aliado a isso, vem ocorrendo um intenso aumento no registro de novos produtos, atingindo o maior valor da série histórica em 2019, com 474 novos registros, como pode ser observado na Figura 1.1, segundo informações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2020).

Figura 1.1: Número de registro de agrotóxicos e afins registrados anualmente, entre 2012 e 2019



Fonte: BRASIL, 2020

Assim, pode-se relacionar uma maior quantidade e diversidade de agrotóxicos a um aumento de riscos potenciais, uma vez que um baixo percentual desses produtos atinge o seu alvo causando, portanto, grandes perdas para os diversos compartimentos do ambiente e

subsequente contaminação (SPADOTTO et al., 2010). Uma das fontes dessa contaminação está associada ao descarte incorreto das embalagens, que, na ausência de uma política efetiva de gestão e gerenciamento desses resíduos, cresce proporcionalmente a quantidade de produtos comercializados (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2005, OLIVEIRA, 2019).

Com relação à toxicidade e alterações ecológicas causadas pelas formulações comerciais dos agrotóxicos, estas podem ser intensificadas pelo estresse de outros fatores ambientais. A temperatura, salinidade, intensidade de luz, umidade e nutrientes podem afetar direta ou indiretamente a exposição aos contaminantes, influenciando e definindo as características químicas e físicas dos habitats de populações de um ecossistema, tornando-se assim, necessária a investigação de cenários, onde ocorre a influência de múltiplos fatores sobre os agrotóxicos, possibilitando o estudo de situações mais realísticas (ARTIGAS et al., 2012).

Com as previsões para o aumento na temperatura média global e outras mudanças climáticas, como a alteração dos regimes pluviométricos (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC, 2019), a avaliação da influência desses fatores na toxicidade se torna imprescindível, especialmente no contexto brasileiro. Diversos autores destacam a influência da temperatura sobre a toxicidade de poluentes (BELL et al., 2007; NOYES et al., 2009; VAN DEN BRINK et al., 2018), entretanto, ainda são escassos estudos que avaliem esse parâmetro em um contexto ambiental tropical levando em consideração características mais realísticas.

Neste sentido, a Ecotoxicologia se torna uma ferramenta fundamental para avaliação, uma vez que busca estudar os efeitos das mais diversas substâncias sobre os ecossistemas, por meio de avaliação, monitoramento e diagnósticos dos efeitos sobre as populações, comunidades e ecossistemas, levando em conta a sua estrutura, função e interações com o ambiente (BELDEN, 2020). Segundo Tarazona e Dohmen (2008), essa ciência atua no desenvolvimento de métodos para avaliar se um impacto ocorrido foi suficiente para comprometer a sustentabilidade dos ecossistemas, contribuindo para a determinação de condições de uso e gestão de substâncias químicas ou outros agentes, buscando reduzir ao máximo os riscos associados.

Muitos organismos podem ser utilizados para fins de testes de toxicidade, sendo que os critérios para escolha são a representatividade e importância ecológica, facilidade de cultivo e ciclo de vida conhecido, permitindo a reproduzibilidade dos testes (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008).

Em relação aos testes, eles podem ser classificados em agudos ou crônicos, sendo diferenciados pela duração e pelas respostas finais mensuradas, uma vez que, dependendo da concentração, alguns contaminantes podem causar desde a morte de organismos até distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais. Os testes de toxicidade aguda apresentam curta duração em relação à vida do organismo, tendo como propósito identificar respostas específicas mensuráveis de um organismo ou população a uma concentração ou dose de um determinado agente potencialmente tóxico. Em um teste de toxicidade aguda normalmente se mede a letalidade ou outra manifestação anterior a ela, como a imobilidade (COSTA et al., 2008).

Por outro lado, um poluente ou composto pode não ocasionar imobilidade ou letalidade e ser tóxico a um determinado organismo ou população. Por meio de testes de toxicidade crônica é possível identificar efeitos adversos de parte ou de todo ciclo de vida de um organismo, avaliando os efeitos sub-letais.(COSTA et al., 2008; MOZETO; ZAGATTO, 2008).

Para a realização dos testes de toxicidade, podem-se realizar estudos laboratoriais envolvendo uma única espécie, o que proporciona máxima praticidade e reprodutibilidade. Porém, esse tipo de investigação apresenta limitações em prever os efeitos de um contaminante no nível de comunidade ou ecossistêmico, não levando em conta fatores como as condições ambientais e as interações que podem alterar a toxicidade de um composto (BIDWELL, 2020). Com isso, a adoção de modelos ecossistêmicos como mesocosmos, tem impacto na relevância do estudo, representando um meio-termo entre estudos laboratoriais e os estudos em campo, e permitindo uma avaliação mais profunda do efeito do contaminante nos processos biológico (BIDWELL, 2020).

Assim, a partir de uma abordagem ecotoxicológica buscou-se investigar a toxicidade aguda da água percolada através do solo dos agrotóxicos Kraft® e Score® em organismo aquático padronizado, *Daphnia similis*. Foram empregados para isso mesocosmos, que consistiam em modelos experimentais de simuladores água-solo sob a influência de variações na temperatura, devido à perspectiva de mudanças climáticas.

## 2 Objetivos

Este estudo teve como principal objetivo avaliar os efeitos tóxicos da água percolada no cladócero *Daphnia similis*, após a aplicação dos agrotóxicos comerciais Kraft® (i.a. abamectina) e Score® (i.a. difenoconazol), isoladamente e em misturas, seguidos de simulações de chuvas ou da ocorrência de precipitação natural. Foram avaliados três cenários diferentes: sob temperatura controlada de 23°C e 33°C e sob condições ambientais naturais.

### 2.1 Objetivos específicos

- Simular as condições da aplicação dos agrotóxicos Kraft® e Score®, isoladamente e em mistura, para cultura de morangos e avaliar a suscetibilidade das águas subterrâneas a esses compostos, após a ocorrência de eventos de precipitação;
- Avaliar e comparar a toxicidade dos agrotóxicos Kraft® e Score®, isoladamente e em mistura, no percolado por meio dos testes padronizados de toxicidade aguda no cladócero *Daphnia similis*;
- Analisar a influência do aumento da temperatura, de 23 e a 33°C, na toxicidade dos agrotóxicos, por meio da expressão de toxicidade do percolado;
- Analisar a influência das variações diárias das condições ambientais naturais como temperatura, luminosidade e pluviosidade na toxicidade dos percolados contendo os agrotóxicos Kraft® e Score®, isolados e em mistura.



### 3 Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Toxicidade de agrotóxicos e a influência da temperatura

A toxicidade é a capacidade de uma substância exercer um efeito nocivo sobre um indivíduo ou sobre a biocenose, estando dependente de diversos fatores como propriedades químicas e físicas do ambiente e da substância, concentração, duração e frequência da exposição e relação com o ciclo de vida dos organismos (RONCO; BAÉZ; GRANADOS, 2004).

Substâncias ou agentes tóxicos podem alcançar ambientes aquáticos pelas mais diversas vias, como lixiviação, escoamento superficial ou até deposição atmosférica, estando sujeitos a transformações, como hidrólise, fotólise, complexação e biodegradação (COSTA et al., 2008; JONES; LASSITER, 2020). Além disso, a vida aquática pode ser impactada por contaminantes presentes nos diversos compartimentos, o que inclui a água superficial, a água subterrânea, os sedimentos e até na cadeia alimentar (JONES; LASSITER, 2020). Por fim, como, uma determinada espécie realiza biotransformação de um contaminante pode levar a uma resposta tóxica bastante diversa. Isso ocorre pelo fato de que um metabólito resultante desse processo pode ser mais ou menos tóxico para um organismo, em comparação ao contaminante de origem, ou, por outro lado, caso ocorra uma baixa biotransformação do composto, ele pode aumentar a sua meio-vida e persistência no ambiente (LIU; POPE, 2020).

Assim, os efeitos deletérios causados por um único composto são resultantes de interações complexas entre ele, os organismos, e todos os fatores bióticos e abióticos do ambiente do meio aquático, que pode conter diversas substâncias presentes com o potencial de interagir e alterar a expressão de toxicidade. Com relação às misturas de dois ou mais contaminantes, os efeitos tóxicos podem ser: sinérgicos potencializados, quando a soma dos efeitos individuais é inferior ao da mistura; sinérgico antagônico, quando a soma dos efeitos individuais é superior ao da mistura; e aditivo, quando a mistura não influencia no efeito tóxico de cada contaminante. (HODGSON; WALLACE, 2012; JONES; LASSITER, 2020; MOZETO; ZAGATTO, 2008). Quanto aos agrotóxicos, comumente aplicados em misturas, torna essencial a necessidade do estudo da toxicidade de combinações entre mais de um desses compostos (MATTOS et al., 2002; ZILEGER, 2008). Trabalhos recentes constataram o aumento da toxicidade em organismos aquáticos na presença de misturas de agrotóxicos, o que reforça essa necessidade (SANCHES et al., 2018; WU et al., 2018).

Deve-se levar em conta ainda a influência de estressores ambientais na expressão da toxicidade dos agrotóxicos, em especial a temperatura, tendo em vista a perspectiva do

aquecimento global em até 1,5°C entre 2030 e 2050, se esse processo se mantiver no ritmo atual (IPCC, 2018). Segundo Cerezer et al. (2020), altas temperaturas podem implicar em um aumento do consumo e da toxicidade de moléculas orgânicas, com a aceleração do metabolismo e a gasto das reservas energéticas. Além disso, ocasiona de um efeito indireto na capacidade de defesa de um organismo, tornando este suscetível a danos a nível celular. Este efeito foi observado no estudo de Jacquin et al. (2019), com o peixe *Carassius auratus*, submetido a misturas de herbicidas com diferentes modos de ação, onde verificou-se que o aumento de 22°C a 32°C intensificou o efeito adverso a nível molecular e celular. Um estudo realizado por Laetz et al. (2014) encontrou resultados convergentes a esse comportamento, em que houve aumento da neurotoxicidade, em salmões prateados juvenis, ocasionada pela mistura de agrotóxicos, que estaria diretamente relacionada ao aumento da temperatura.

Por outro lado, De Beeck et al. (2017) chamam atenção para o fato de que apesar da preocupação com o efeito sinérgico dos agrotóxicos, no contexto do aquecimento global, alguns processos podem neutralizar esses efeitos como a maior degradação desses compostos em temperaturas mais elevadas e a adaptação das populações a essas condições, fenômeno identificado pelo experimento realizado pelos autores com o uso do inseticida clorpirofós em bateladas, utilizando o organismo *Ischnura elegans*, com as temperaturas 20 e 24°C. Esse efeito adaptativo também pode estar relacionado aos resultados encontrados pelo estudo de Silva, Daam e Gusmao (2020), que utilizando o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* para estudar o efeito da aclimatação na sensibilidade do organismo ao agrotóxico Glifosato, identificaram um efeito protetivo correlacionado a exposição do organismo ao aumento de temperatura.

Outro aspecto do aquecimento global está relacionado à intensificação das variações de temperatura ao longo do dia, podendo apresentar maiores amplitudes, o que pode ter um efeito mais danoso para os organismos do que o aumento da temperatura média (DELNAT et al.; 2019; VASSEUR et al., 2014; VERHEYEN; STOKS, 2019). O estudo de Verheyen e Stoks (2019), por exemplo, concluiu que as exposições de larvas de *Ischnura elegans* ao inseticida clorpirofós, em condições de temperatura constante resultaram em efeitos não significativos na mortalidade e crescimento, enquanto que sob condições de variações diárias de temperatura (VTD) de 5°C e 10°C resultaram em aumento da mortalidade e redução do crescimento. Por outro lado, o trabalho de Delnat et al. (2019), utilizando o mesmo agrotóxico, sob temperatura constante e VTD de 7°C e 14°C, quando aplicado individualmente não encontrou efeitos sobre as larvas de *Culex pipiens*, porém, ao ser utilizado em mistura com o biocida *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, apresentou efeitos

interativos diversos, como efeitos aditivos na mortalidade sob temperatura constante e com VTD de 7°C e efeitos sinérgicos com VTD de 14°C.

### 3.2 Agrotóxicos utilizados no estudo: Kraft 36 EC® e Score® 250 EC

Os compostos estudados, o Kraft® é um inseticida enquanto o Score® é um fungicida sistêmico, sendo ambos classificados como pertencentes à Classe II, considerados, portanto, como muito perigosos ao meio ambiente. A abamectina, princípio ativo do pesticida Kraft 36 EC® (denominada anteriormente Vertimec 18EC®), é um composto membro do grupo das avermectinas, sendo altamente lipofílico, dissolvendo na maior parte dos solventes orgânicos, e assim com baixa solubilidade em água (FISHER; MORZIK, 1989). A abamectina estimula a liberação de GABA (ácido gama aminobutírico) em organismos e possui um curto tempo de meia-vida (4-21 horas), sendo rapidamente fotodegradada em compostos com menor atividade biológica (HALLEY et al., 1993). Entretanto, a despeito da rápida degradação, apresenta elevada toxicidade, como demonstra o estudo de Casali-Pereira et. al (2015) que utilizaram cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* realizando testes de toxicidade aguda, obtendo um CE<sub>50</sub> (Concentração efetiva mediana) (48h) de 1,47 µg de ingrediente ativo (i.a.)/L, enquanto que nos testes crônicos foram obtidos os valores de CENO (Concentração de efeito não-observado) (8 dias) de 169 ng i.a./L para sobrevivência e 84 ng i.a./L para fertilidade (número de neonatos por fêmea). Outros trabalhos corroboram com o indício de risco potencial desse composto para vida aquática, como Novelli et al. (2012), que encontraram valores de CE<sub>50</sub> (48 h) para *Daphnia similis* de 5,1 ng i.a./L, além de 2,67 µg i.a./L para *Chironomus xanthus* (96h) e de 33 µg i.a./L para *Danio rerio* (48h).

O difenoconazol, princípio ativo do pesticida Score® 250 EC, é um composto membro do grupo triazol e sua principal via de ação tóxica ocorre pela depressão do sistema nervoso central. Quanto ao tempo de meia-vida é de cerca de um (1) dia na água e entre 149-187 dias no solo e possui ainda grande potencial de bioacumulação, como informa a bula comercial (SYNGENTA, 2011). Poucos trabalhos foram publicados investigando possíveis efeitos do difenoconazol em organismos aquáticos. Dentre eles, o de Mu et. al (2013) que obtiveram valores para CL<sub>50</sub> (concentração responsável por mortalidade de 50% da população) referentes a três fases de desenvolvimento de *Danio rerio*: 1,17 mg/L para fase larval, 1,45 mg/L para a adulta e de 2,34 mg/L para a embrionária. O trabalho também indicou inibição de ganho de peso em adultos com uma concentração de 0,25 mg/L, durante 7 dias de exposição.

No contexto regional do presente trabalho, a toxicidade em organismos aquáticos das aplicações em misturas, dos agrotóxicos Kraft 36 EC® e Score 250 EC®, já foi tema de

investigação realizada nos trabalhos de Moreira et al. (2017) e Sanches et al. (2018). No trabalho de Moreira et. al (2017), avaliando a contaminação por pulverização e escoamento superficial dos agrotóxicos, com concentração dos ingredientes ativos variando de 0 a 2000 µg/L para o difenoconazol e de 0 a 9 µg/L para a abamectina, encontrou-se um efeito antagônico da mistura em baixas concentrações e sinérgico em alta concentrações. Corroborando com isso, o trabalho de Sanches et al. (2018), realizando testes de toxicidade agudo e crônico em peixes *Danio rerio*, chegou a mesma conclusão com relação as misturas: efeito antagônico em baixas concentrações e sinérgico em altas concentrações.

Mais recentemente, o trabalho de Figueirêdo et al. (2020), parte integrante do projeto no qual foi desenvolvido o presente trabalho, também estudou os efeitos dos dois agrotóxicos, Kraft 36 EC® e Score 250 EC®, aplicados individualmente e em mistura, em diferentes temperaturas (23°C e 33°C) sobre a reprodução de colêmbolos *Folsomia candida*. O Kraft®, quando aplicado isoladamente e na mistura, se mostrou altamente tóxico, especialmente sob temperaturas menores, enquanto que o Score® não apresentou efeito tóxico.

### 3.3 Sistemas solo-água

O destino de um agrotóxico em um sistema solo-água se relaciona intimamente a natureza da partição entre o vapor, a solução e as partículas do solo, a qual depende de propriedades físicas e químicas tanto do agrotóxico quanto do solo. A capacidade de um tipo de solo adsorver um agrotóxico é determinante e à medida que moléculas não adsorvidas são movimentadas com a água, aumenta-se o risco de contaminação de águas subterrâneas (ARIAS-ESTÉVEZ, 2008; SARKAR et al. 2020; SILVA; FAY, 2004), o que é comprovado pelos trabalhos de Silva et al. (2011) e Wu et al. (2014), que já encontraram registros de resíduos de agrotóxicos em águas subterrâneas.

O escoamento superficial e lixiviação podem dispersar os agrotóxicos pelo ambiente. No escoamento, a água percorre a superfície com baixa infiltração no solo, podendo carregar consigo agrotóxicos dissolvidos, bem como aqueles suspensos em material particulado e adsorvidos, relacionando-se, portanto, a contaminação de águas superficiais. Já na lixiviação, há o transporte para camadas sub-superficiais percolando o solo, tornando o agrotóxico lixiviado um potencial poluidor de águas subterrâneas, e tal potencial depende, contudo, de características como profundidade da água subterrânea e grupo geológico do local. Normalmente consideram-se problemas de águas superficiais e subterrâneas separadamente, porém, os ciclos hidrológicos possibilitam uma conexão direta entre elas, como exemplo a recarga de um aquífero por águas superficiais (SILVA; FAY, 2004).

Arias-Estévez et al. (2008) ressaltam que um agrotóxico pode ser retido pelo solo, impedindo que fique disponível em águas superficiais e subterrâneas no curto prazo, mas substâncias persistentes vão continuar a ser um risco para o meio ambiente e para a saúde humana. Assim, os autores frisam que é indispensável uma abordagem multidisciplinar para o desenvolvimento de ferramentas e técnicas que permitam tomadas de decisão que sejam efetivas para o ambiente.

O uso de simuladores solo-água vai nesse sentido, ao tentar prever o comportamento dos agrotóxicos em condições e com estrutura específicas (como o tipo de solo), permitindo a avaliação da interação com o solo, bem como efeitos do escoamento superficial e da lixiviação, e relacionar todos esses fatores com a toxicidade em organismos não alvo (CHELINHO et al., 2012; LEITÃO et al., 2014).

### 3.4 Ensaios de toxicidade

A toxicidade de um agrotóxico ou outro agente químico em ambientes aquáticos pode ser avaliada utilizando-se ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos associados. Segundo Aragão e Araújo (2008), vários ensaios de toxicidade se encontram estabelecidos e padronizados por associações e organizações de normalização, nacionais e internacionais, como Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e International Organization for Standardization (ISO).

Aragão e Araújo (2008) lembram ainda que os ensaios de toxicidade podem ser realizados em campo, em que costumam ser mais realísticos, utilizando-se de várias espécies em condições naturais, porém há dificuldade em serem reproduzidos e comparados, ou ainda em condições laboratoriais, sendo menos elaborados, mais baratos e possibilitam uma maior facilidade de se trabalhar com diversos parâmetros específicos, como pH, temperatura, concentrações de um agente específico, e apesar do teste ser feito com uma única espécie, o que aparentemente poderia afetar a confiabilidade dos resultados, alguns estudos apontam para resultados semelhantes aos ensaios com várias espécies, sendo suficiente na realização de testes.

Além disso, há dois tipos principais de testes de toxicidade que podem ser realizados com organismos aquáticos: agudos e crônicos, que se diferem na duração e respostas finais analisadas: enquanto os testes de toxicidade crônica apresentam período de duração variável, podendo compreender um ciclo de vida completo ou parte desse ciclo de um organismo-teste para estimar efeitos de agentes químicos, os testes de toxicidade aguda buscam avaliar efeitos em um curto espaço de tempo em comparação ao tempo de vida de uma espécie, comumente

expresso na forma de mortalidade ou algum efeito que antecede a mortalidade (DODDS, WHILES, 2010). Assim, conseguem estimar a concentração de um agente tóxico que pode causar algum efeito, como número de organismos mortos ou imóveis, em um período que normalmente varia de 24 a 96 horas (COSTA et al., 2008).

Em especial, os organismos da ordem Cladocera são usados no mundo todo como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos, pois possuem algumas características diferenciais como tamanho pequeno, sensibilidade à maioria das substâncias tóxicas, reprodução predominantemente por partenogênese, taxas de rápido crescimento populacional e ainda são filtradores, retendo partículas, microrganismos e algas (SAMA; NANDINI, 2006). Dentro dessa ordem, as espécies dos gêneros *Daphnia* e *Ceriodaphnia* vêm sendo utilizadas como organismos para testes de toxicidade de diversas substâncias, como metais, surfactantes e agrotóxicos (BIDWELL, 2020; LAVORGNA et al., 2016; NOVELLI et al., 2012).

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Experimentos em mesocosmos

Para os experimentos foram utilizados 12 mesocosmos, que consistiam em tanques de fibra de vidro em forma cilíndrica (0,52 m de diâmetro e 0,67 m de altura), com seu fundo afunilado para facilitar a coleta da água percolada. Foram ainda fixados tubos de PVC ao fundo das estruturas, com válvula acoplada que permitiram o armazenamento do percolado em galões de polietileno (com armazenamento máximo de 5 L) (Figura 4.1).

Figura 4.1: Mesocosmos montados para a coleta de água



Fonte: O Autor

Os tanques foram internamente revestidos com sacos plásticos para evitar a contaminação das estruturas. Além disso, a parte interna do fundo das estruturas foi preenchida com cascalho (brita) e uma peneira plástica, estabilizando o solo e reduzindo a perda de material com a ação da água (Figura 4.2).

Figura 4.2: Procedimento de montagem dos simuladores, com detalhe para a parte interna dos mesmos, com a peneira e cascalho.



Fonte: O Autor

O solo utilizado para preencher o interior dos simuladores foi coletado nas dependências do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA - EESC/USP), no município de Itirapina, São Paulo, onde não há nenhum histórico de contaminação, considerando os últimos 20 anos (CHELINHO et al., 2012; NUNES, 2010; NUNES; ESPÍNDOLA, 2012). Com o auxílio de um trator, o solo foi coletado, transportado e armazenado em caixas d'água de polietileno (Figura 4.3 e Figura 4.4). Gradualmente, o solo foi peneirado manualmente, utilizando-se uma peneira com aro de madeira e abertura de aproximadamente 5 mm, buscando eliminar estruturas maiores como pedras, raízes, macrofauna, entre outras (Figura 4.5 e Figura 4.6); e, além disso, foi aquecido em estufas, no interior de bandejas de aço galvanizado, sob temperatura controlada de 60°C, permitindo a desfaunagem, para posterior utilização nos ensaios.

Figura 4.3: Coleta do solo nas dependências do CRHEA



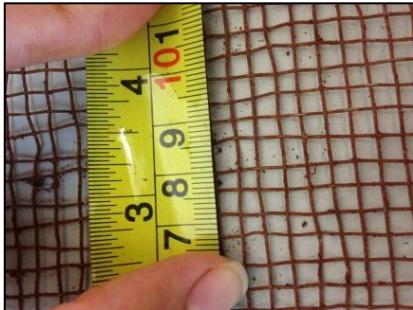
Fonte: O Autor

Figura 4.4: Armazenamento do solo em caixas d'água



Fonte: O Autor

Figura 4.5: Detalhe da peneira utilizada no peneiramento do solo



Fonte: O Autor

Figura 4.6: Realização do peneiramento do solo



Fonte: O Autor

Antes da realização dos experimentos, cada um dos mesocosmos foi preenchido com um volume de  $0,1\text{ m}^3$  de solo, assim permanecendo durante três dias até os experimentos; em seguida, foram separados, de acordo com o tratamento que receberiam, em três réplicas cada: Kraft (K), Score (S), Kraft + Score (K+S) e Controle (C). As baterias de simulações foram realizadas em três diferentes condições de temperatura: em temperatura controlada de  $23\pm3^\circ\text{C}$ , em temperatura controlada de  $33\pm3^\circ\text{C}$ , e em condições ambientais naturais, com as características do verão da região, chegando a altas temperaturas e com alta incidência de chuva. Nas condições de temperatura controlada foram dispostos os 12 tanques em sala climatizada, com uma estrutura com lâmpadas fixadas para a simulação de luz solar, com fotoperíodo programado para 16 horas claro e 8 horas escuro. No experimento em condições ambientais naturais, por insuficiência de solo tratado, um dos tanques controle não pôde ser utilizado, sendo que os 11 tanques remanescentes foram dispostos ao ar livre.

Adicionalmente, para simular as condições encontradas no em regiões de uso agrícola, foram plantadas 15 sementes da monocotiledônea *Allium cepa* (tipo baia periforme) e 15 sementes da dicotiledônea *Lycopersicon lycopersicum* (tipo Santa Cruz Kada), espécies para as quais o uso dos agrotóxicos em questão é recomendado, distribuídas com o auxílio de um aparato ilustrado na Figura 4.7.

Figura 4.7: Moldes para abertura dos buracos destinados às sementes



Fonte: O Autor

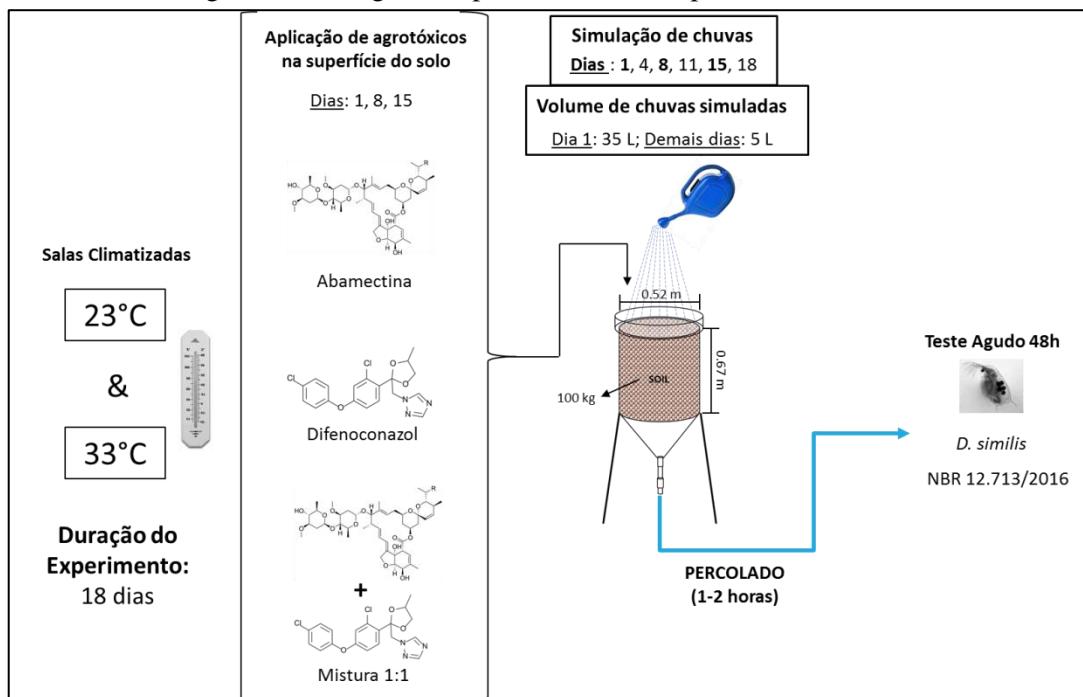
O cronograma dos experimentos controlados foi realizado conforme seguinte programação, com três repetições a cada sete dias: No 1º dia: aplicações dos agrotóxicos seguidas de simulações de chuva e no 4º dia: simulação de chuva. O uso de agrotóxicos nos mesocosmos seguiu as concentrações recomendadas pelos fabricantes (Cheminova para o Kraft® e Syngenta para o Score®, nas suas formulações comerciais) levando-se em consideração os valores para a cultura de morango, o que corresponde, em termos dos ingredientes ativos, 10,8 g de abacmetina por hectare e 20,0 g de difenoconazol por hectare, ingredientes ativos do Kraft e Score, respectivamente.

A solução de aplicação, ou calda, quando formulada para os mesocosmos com tratamento individual dos respectivos agrotóxicos, foi preparada em 1 litro de água destilada, e para os mesocosmos com tratamentos de mistura dos agrotóxicos, foram preparadas soluções individuais dos agrotóxicos em 0,5 litro de água Milli-Q®, em que, após a aplicação, resultaria em concentração equivalente a das concentrações dos produtos em aplicações individuais. Após preparadas, as caldas eram transferidas para borrifadores manuais, seguindo recomendações de segurança ao serem aplicadas sobre o solo, aplicações essas que duravam cerca de 30 minutos. Após o preparo, reservou-se uma alíquota de cada solução para se determinar a concentração efetiva do ingrediente ativo de cada pesticida, utilizando-se cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC/DAD).

As simulações de chuva foram realizadas com água do poço artesiano que abastece o CRHEA. Padronizou-se para que as chuvas iniciais fossem realizadas com 35 L de água, para que houvesse volume de amostra suficiente para leitura de parâmetros, quantificação de nutrientes e a realização dos testes de toxicidade aguda. Cabe ressaltar, que no experimento realizado em condições ambientais naturais, os mesocosmos estavam suscetíveis a eventos chuvosos, sendo que desta maneira as simulações foram adaptadas de maneira a se aproximar ao máximo do desenho experimental planejado.

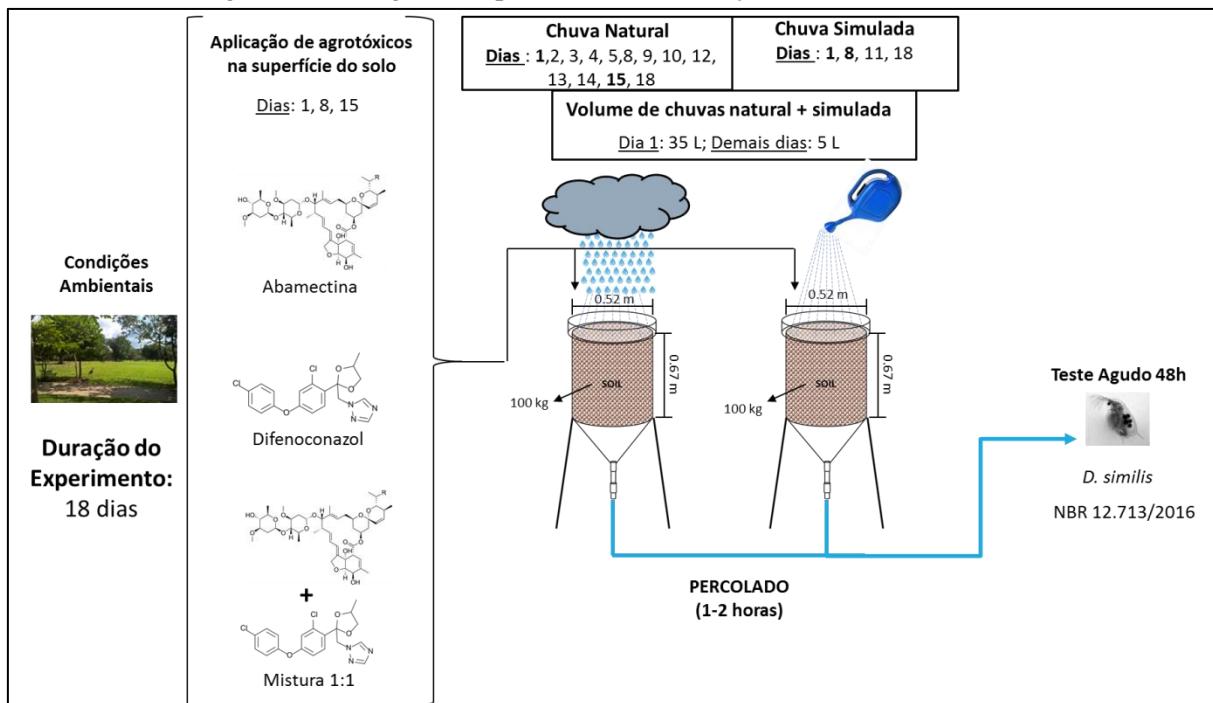
Na Figura 4.8 e na Figura 4.9 estão detalhados os designs da realização dos experimentos realizados em temperatura controlada e em condições ambientais naturais, respectivamente.

Figura 4.8: Design do experimento sob temperatura controlada



Fonte: O Autor

Figura 4.9: Design do Experimento sob condições ambientais naturais



Fonte: O Autor

#### 4.2 Dados climatológicos

Para etapa do experimento realizada sob condições ambiente tornou-se necessário obter os registros relativos às condições de tempo, incluindo os dados de precipitação, por meio das leituras do pluviômetro Ville de Paris, e para as condições de temperatura, por meio das leituras do psicrômetro, instrumentos pertencentes à Estação Climatológica, localizada no CRHEA-USP.

Além disso, utilizou-se também Data Loggers Hobo® distribuídos no solo dos mesocosmos, dispostos superficialmente e enterrados, para a medição da incidência luminosa e temperatura.

#### 4.3 Testes de toxicidade com organismos aquáticos

Coletadas após a simulação de cada evento chuvoso (dias 1, 4, 8, 11, 15 e 18), as amostras de água percolada foram aclimatadas a temperatura de  $22 \pm 2$  °C para realização dos testes de toxicidade aguda, com 48 horas de duração, para o organismo-teste *Daphnia similis*, de acordo com a norma já padronizada para a espécie ABNT (2016).

Os organismos utilizados nos ensaios são cultivados e mantidos nos laboratórios do NEEA/CRHEA – EESC/USP, nos quais foram seguidas as recomendações de manutenção e cultivo definidas pela mesma norma já citada.

#### 4.4 Análises físicas e químicas das amostras de solo e água

As análises físicas e químicas foram feitas nas amostras de água de abastecimento para preparo das soluções teste, do percolado após a passagem pelos solos dos simuladores e do solo para sua caracterização, sendo estas últimas realizadas no Departamento de Geotecnica, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo – EESC/USP.

Os parâmetros analisados, método e respectiva referência, constam na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Metodologias e referências utilizadas nas análises das variáveis químicas da água e solo (em negrito as variáveis já quantificadas até o presente momento).

Matriz analisada	Variável	Método	Referência
Água de abastecimento para preparo das soluções teste e água após percolação pelos solos dos simuladores	<b>pH</b>	Potenciômetro	-
	<b>Condutividade</b>	Condutivímetro	-
	<b>Oxigênio dissolvido</b>	Medidor de OD	-
	<b>Turbidez</b>	Espectrofotometria	APHA (1995)
	<b>Material em suspensão</b>	Gravimetria	WETZEL; LIKENS (1991)
	<b>Nitrito e nitrato</b>	Espectrofotometria	MACKERETH et al (1978)
	<b>Nitrogênio total</b>	Espectrofotometria	APHA (1995)
	<b>Fósforo total e suas formas dissolvidas</b>	Espectrofotometria	ANDERSEN (1976)
	<b>Íon amônio</b>	Espectrofotometria	KOROLEFF (1976)
	<b>Concentração dos agrotóxicos estudados</b>	Cromatografia gasosa	LANÇAS (1997)
Solo	<b>pH</b>	Potenciômetro	MONTEIRO; FRIGHETTO (2000)
	<b>Umidade</b>	Gravimetria	MONTEIRO; FRIGHETTO (2000)
	<b>Matéria orgânica</b>	Incineração	TRINDADE (1980)
	<b>Granulometria</b>	Peneiramento	ABNT (1988)

Fonte: O Autor

#### **4.5 Análise de Dados**

Nos resultados do teste de toxicidade, para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os resultados obtidos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey (comparações múltiplas entre os tratamentos), ambas com nível de significância de 5%. Em seguida utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida de Dunnett, para a comparação dos resultados obtidos nos tratamentos que receberam agrotóxicos em relação ao controle, ambas também com nível de significância de 5%. Quando conveniente, calculou-se a média, associada ao respectivo desvio padrão para uma melhor visualização dos valores observados. O programa utilizado para tais análises estatísticas foi o GraphPad Prism 6.0.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Determinação dos princípios ativos nos produtos comerciais

Por meio da espectrometria de massas, realizada pela Algaetech Pesquisa LTDA, foi possível determinar as concentrações dos princípios ativos Abamectina e Difenoconazol contidos nas caldas preparadas com os produtos comerciais Kraft® e Score®, respectivamente, para as aplicações individualizadas e em mistura, e compará-las com as concentrações teóricas esperadas em ambas as situações, com base das informações contidas nas bulas dos produtos.

A análise realizada apresenta limite de detecção (LD) de 0,05 mg/L para abamectina e de 0,01 mg/L para o difenoconazol e apresenta limite de quantificação (LQ) de 0,165 mg/L e 0,033 mg/L para estes compostos, respectivamente. Cabe ressaltar, que as concentrações esperadas para a calda dos produtos utilizados nos tanques de mistura devem ser o dobro daquelas esperadas do preparo para a aplicação individual dos produtos.

O resultado das análises como pode ser visto na Tabela 5.1, indica que as concentrações de ingredientes ativos nas caldas utilizadas foram superiores às concentrações teóricas calculadas, sendo identificados valores entre 50,5 a 15,7% superiores aos teóricos. Esse aumento pode estar relacionado a, dentre outras possibilidades, variações na formulação dos produtos comerciais. Por outro lado, o trabalho de Sanches et al. (2018), em que também se utilizou os produtos comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC®, analisando a recuperação da abamectina e difenoconazol, na solução estoque e sedimentos, encontrou valores superiores a 100%.

Tabela 5.1: Concentração nominal e real dos princípios ativos dos produtos (mg/L)

Princípio Ativo	Concentração detectada do princípio ativo na calda (mg/L)	Concentração esperada do princípio ativo na calda (mg/L)	Percentual de aumento da concentração detectada em relação a esperada (%)
Abamectina (individualmente)	0,26	0,1728	50,5
Abamectina (mistura)	0,48	0,3456	38,9
Difenoconazol (individualmente)	0,52	0,3500	48,6
Difenoconazol (mistura)	0,81	0,7000	15,7

Fonte: O Autor

## 5.2 Caracterização do solo utilizado nos ensaios

Na região de Itirapina-SP predominam solos dos tipos Latossolo Vermelho-Amarelo e areias quartzosas (PINTO; CRESTANA, 2001). No entorno da represa, onde o solo foi coletado, predominam-se os latossolos vermelho-amarelo, situados em relevos suavemente ondulados, além disso apresentam textura de média a muito argilosa, com argilas de baixa atividade, acidez elevada e bem drenados, ou seja, a água se infiltra com facilidade (OLIVEIRA; PRADO, 1984).

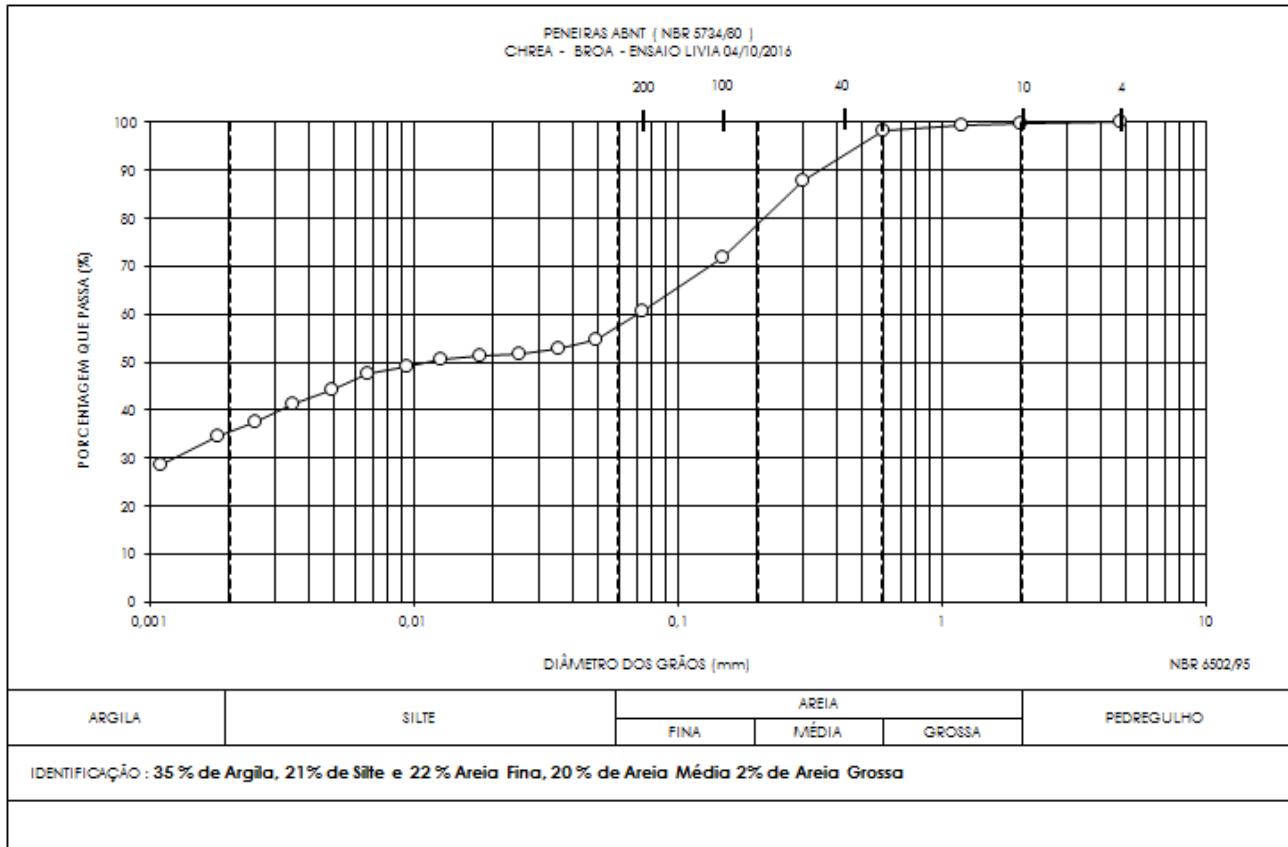
A amostra de solo utilizada na caracterização apresentou as seguintes características: pH de 5,52; capacidade de troca catiônica (CTC) de 3,52 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>; percentual de matéria orgânica de 11,06±0,57%; e granulométrica com frações argila de 35%, silte de 21% e areia 42%, com predominância de areia fina com 22%, consistindo em uma textura média (

Figura 5.1). Os valores encontrados refletem características dos solos da região.

De acordo com Embrapa (2015), o pH e CTC do solo podem ser considerados médio, enquanto que o percentual de matéria orgânica é considerado alto. Em solos intemperizados, a matéria orgânica é em grande parte responsável pelo CTC, porém, mesmo o solo sendo rico em matéria orgânica, para valores de CTC inferiores a 5 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>, a fração argila apresenta baixo teor de argila ou caulinita na mesma proporção que a argila, o que indica que o solo tem pequena capacidade de reter cátions na forma trocável e, portanto, é suscetível à lixiviação (EMBRAPA, 2010).

As características físico-químicas do solo, bem como as características dos próprios agrotóxicos, estão intimamente relacionadas com a retenção ou lixiviação destes (HALL et al., 2015). Os resultados apresentados indicam que o solo utilizado no experimento é suscetível ao transporte de compostos, como os agrotóxicos, por lixiviação, tornando-os disponíveis aos organismos aquáticos.

Figura 5.1: Curva de distribuição granulométrica do solo

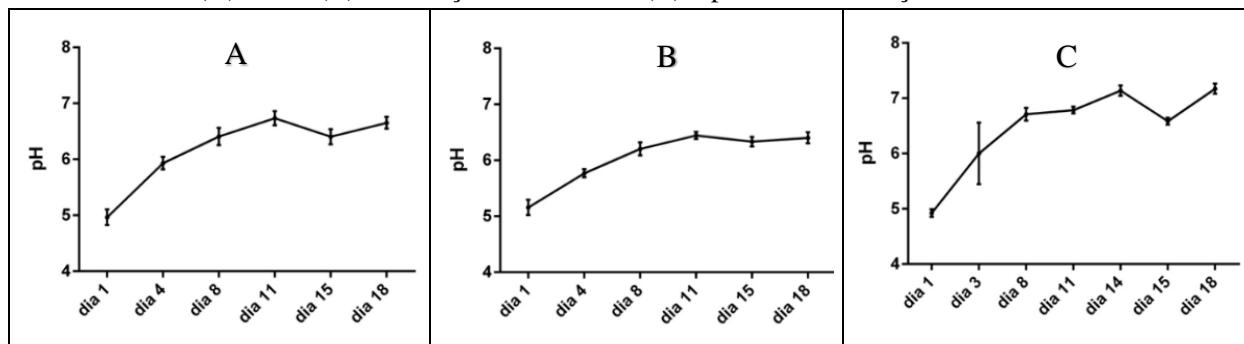


Fonte: O Autor

### 5.3 Parâmetros físico-químicos da água percolada durante as simulações ao longo do tempo

Para todas as condições estudadas, ao longo do experimento, observou-se um comportamento similar, em que o pH da água percolada passou de caráter ácido nos primeiros dias (Dia 1 - 23°C:  $5,16 \pm 0,14$  ; 33°C:  $4,97 \pm 0,14$ ; Condições ambientais:  $4,92 \pm 0,07$ ) para valores próximos a neutro (23°C:  $6,40 \pm 0,10$ ; 33°C:  $6,65 \pm 0,11$ ; Condições ambientais:  $6,585 \pm 0,06$  ), como pode ser observado na Figura 5.2. Observa-se, que nos resultados sob condições ambientais, tanto para o pH quanto os outros parâmetros analisados é possível observar um grande desvio padrão no dia 3 do experimental, decorrente das precipitações naturais entre os dias 1 e 3 do experimento, que ocorreram posteriormente à simulação da chuva no dia, intensificando o processo de lixiviação e antecipando o calendário experimental previsto.

Figura 5.2: Valores de pH (média ± desvio padrão) obtidos nas amostras de água percolada à 23°C (A), 33°C (B) e condições ambientais (C), após cada simulação da chuva.



Fonte: O Autor

Para a dureza, seguindo a classificação do Von Sperling (1997) contida na Tabela 5.2 no primeiro dia de experimento as amostras de percolado apresentaram dureza de moderada à dura e a partir do oitavo dia de experimento foram classificadas como água mole, como pode ser observado na Tabela 5.3.

Tabela 5.2. Classificação da água em função dos valores de dureza.

Dureza (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Classificação
< 50	Água mole
≥ 50 e < 150	Dureza moderada
≥ 150 e < 300	Água dura
≥ 300	Água muito dura

Fonte: Adaptado de Von Sperling (1997)

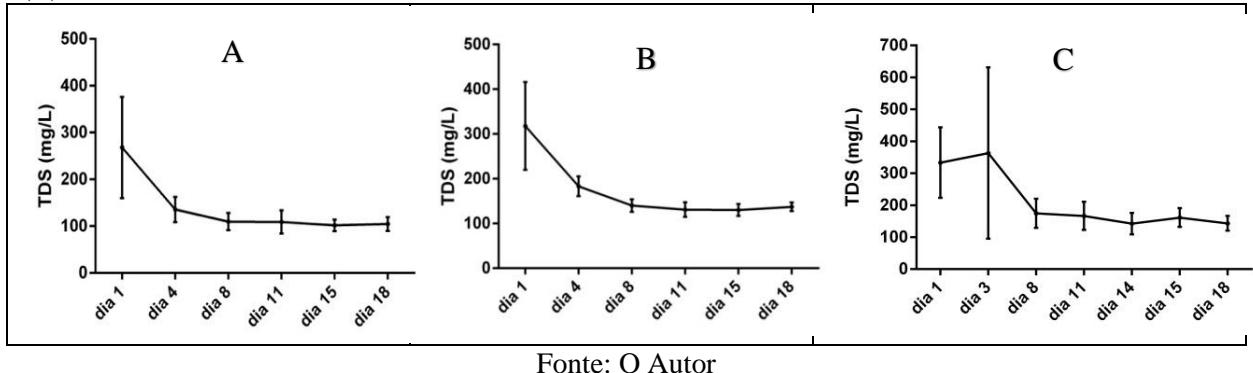
Tabela 5.3: Valores de dureza obtidos após simulação da chuva nos simuladores

Condição do Experimento	Dureza (mg/L CaCO <sub>3</sub> ) nos respectivos dias do experimento						
	Dia 1	Dia 3	Dia 4	Dia 8	Dia 11	Dia 15	Dia 18
23°C	121,3 ± 53,9	-	52,5 ± 15,3	31,7 ± 9,3	28,2 ± 8,6	23 ± 6,4	22,8 ± 5,9
33°C	151,8 ± 56,2	-	63,7 ± 11,3	34,7 ± 8,2	24,8 ± 5	19,1 ± 5,2	19,7 ± 5
Condições ambientais	158,7 ± 61,2	186 ± 153,7	-	36,7 ± 12,3	28,5 ± 11,7	23,6 ± 8,7	27,1 ± 7,5

Fonte: o Autor

Os resultados dos sólidos dissolvidos totais foram análogos ao comportamento dos resultados encontrados para a dureza, ou seja, valores maiores no início e menores no final do experimento, conforme pode ser observado na Figura 5.3

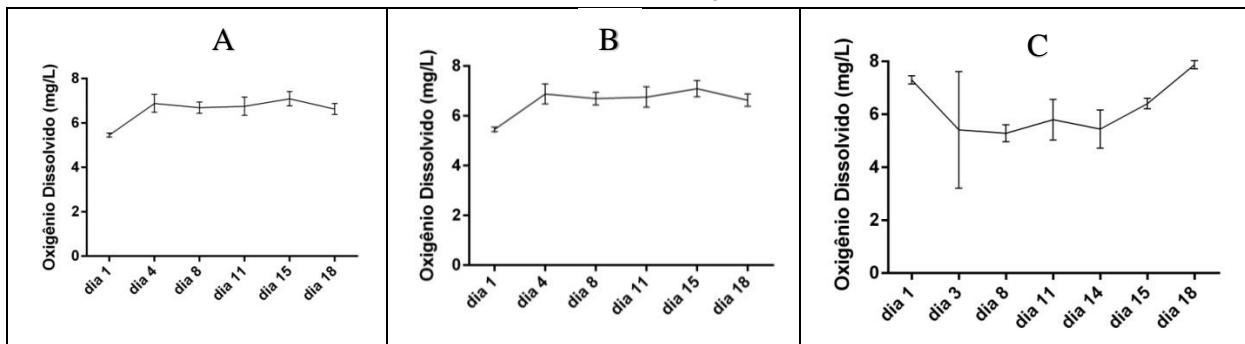
Figura 5.3: Variação dos valores de sólidos dissolvidos (média ± desvio padrão) nas amostras de água percolada nos simuladores ao longo do experimento à 23°C (A), 33°C (B) e sob condições ambientais (C)



Fonte: O Autor

Já o oxigênio dissolvido apresentou valores bastante superiores a 1,0 mg/L, limite a partir do qual ocorrem interferências nos ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, como explicitado na ABNT (2016). Os resultados para as diferentes condições de experimento podem ser observados na Figura 5.4.

Figura 5.4: Concentração de oxigênio dissolvido em mg/L (média ± desvio padrão), dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambientais (C).



Fonte: O Autor

O solo de Itirapina-SP, por conta da alta taxa de pluviosidade é suscetível a lixiviação de íons como cálcio e magnésio, que são básicos, substituindo por elementos acidificantes, como hidrogênio, manganês e alumínio (LOPES, 1989), o que resultou no caráter mais ácido dos percolados nas primeiras simulações de chuvas. Tal alteração nos valores de pH do percolado pode interferir no equilíbrio de dissociação ou grau de ionização de pesticidas, especialmente em inseticidas, como é o caso do Kraft®, alterando sua atividade biológica como relatado por Harris e Foster (1995) o que poderia resultar em uma diminuição da toxicidade destes compostos.

Mesmo com valores de dureza encontrados acima do preconizado pela norma para o cultivo e ensaio com *Daphnia similis* não houve mortalidade dos organismos no controle (tratamento sem agrotóxicos), o que sugere que os organismos testados toleram uma grande faixa de valores de dureza acima daquela preconizada pela norma, como já demonstrado por Rodrigues, Silva e Silva (2009) quando estudaram três bacias dos rios São Raimundo, Tarumã e Educandos, com altos valores para dureza, superiores a 110 mg/L, no qual para a bacia do São Raimundo não apresentaram toxicidade também para *D. similis* para a maioria dos pontos coletados.

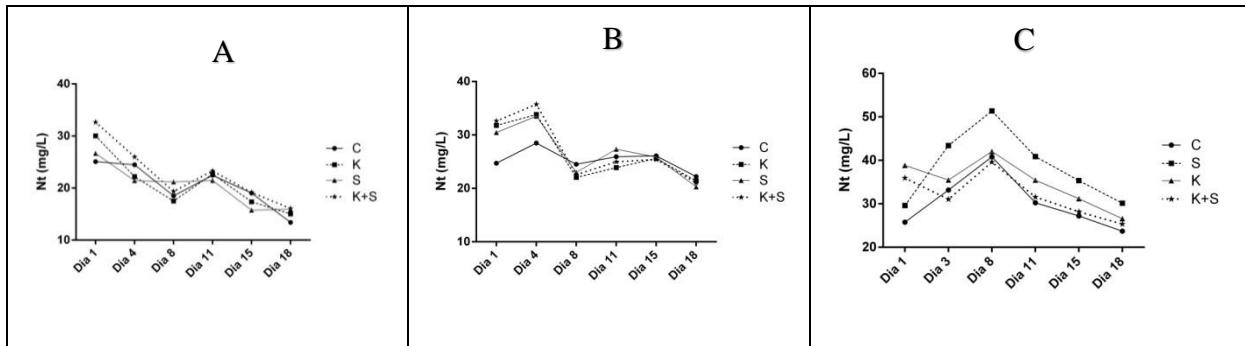
A lixiviação do solo, com consequente produção de sólidos, dissolvidos ou suspensos, pode aumentar a capacidade da água de conduzir corrente elétrica, ou seja, sua condutividade. Segundo a resolução do CONAMA 357/05 para as classes 1 e 2 de águas doces, que são mais restritivas quanto a preservação de comunidades aquáticas, estabelece-se um limite de sólidos dissolvidos totais de 500 mg/L, portanto, superior ao maior dos valores apresentados.

#### **5.4 Nutrientes presentes na água percolada durante as simulações ao longo do tempo**

As concentrações dos nutrientes da série nitrogenada e da série fosforada, o que inclui nitrogênio total, amoniacal, nitrito, nitrato, fósforo total, podem ser observadas respectivamente na Figura 5.5 a Figura 5.11. É possível notar que, apesar das oscilações verificadas, para uma mesma condição de temperatura, os diferentes tratamentos apresentam um comportamento similar, dessa forma, os compostos estudados não interferiram nos nutrientes analisados, e assim serão analisados de maneira conjunta.

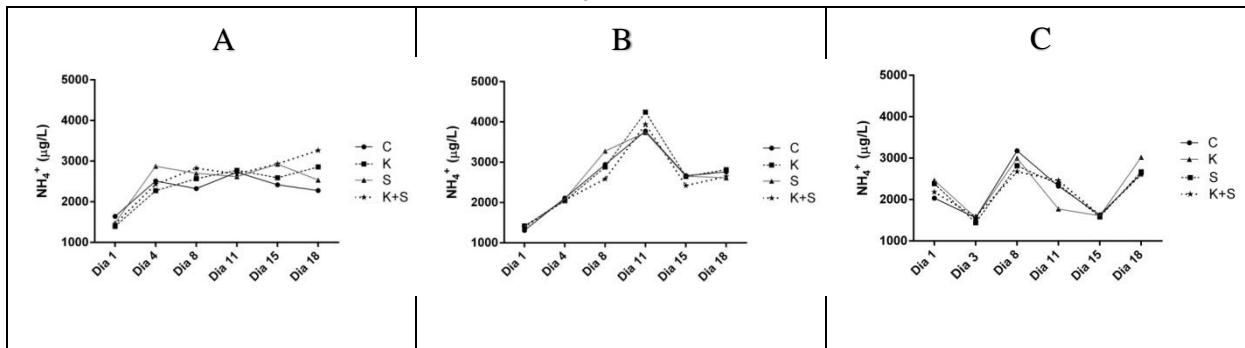
De uma forma geral, ao longo dos experimentos foi observada uma diminuição das concentrações médias destes nutrientes, em especial para o nitrogênio total e amoniacal, nitrito e fósforo total dissolvido para todas as temperaturas testadas. Já o nitrato apresentou também uma redução em sua concentração nas temperaturas controladas, enquanto que sob condições ambientais houve um novo pico a partir do dia 15, voltando a reduzir no dia 18. Para o fósforo total, os picos ocorreram nos dias 1 e 8 para as condições de temperatura controlada, enquanto que sob condições ambientais ocorreram menores variações em relação aos valores médios. E por fim, o fósforo inorgânico que apresentou poucas oscilações, com exceção da condição de temperatura controlada de 33°C, para qual houve um pico nos valores médios do dia 1.

Figura 5.5: Nitrogênio total presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambientais(C)



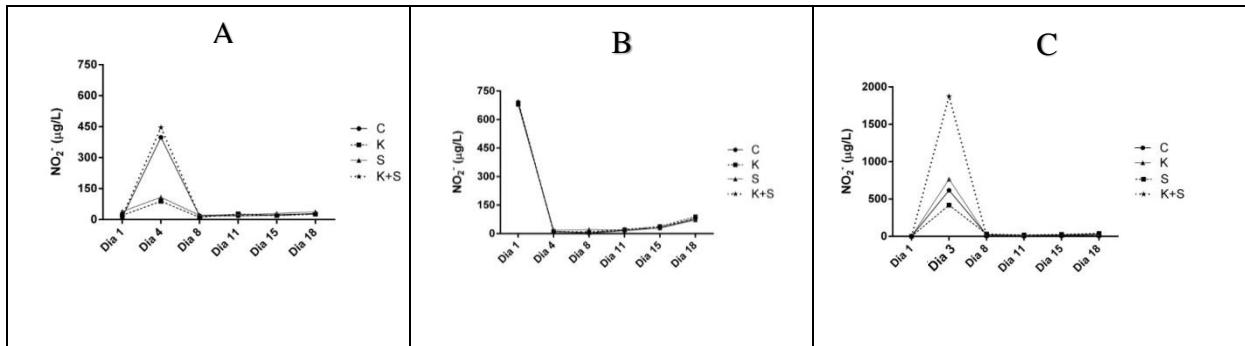
Fonte: O Autor

Figura 5.6: Nitrogênio amoniacal nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambiente(C)



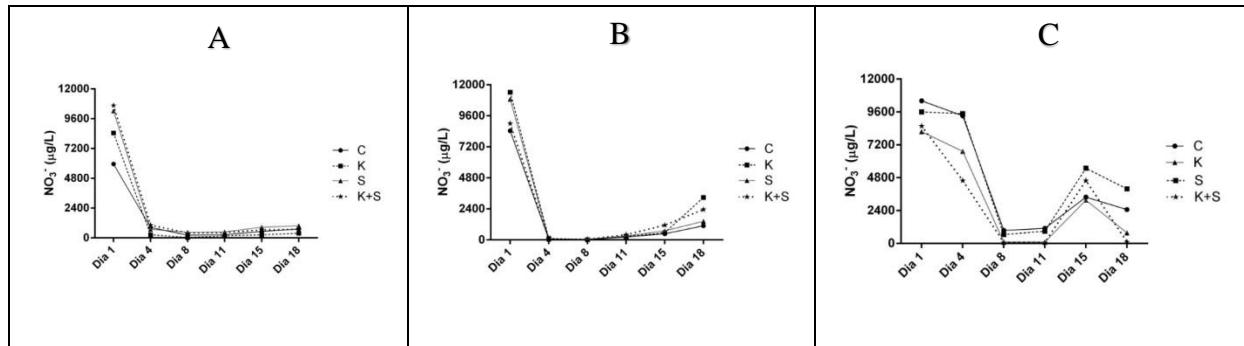
Fonte: O Autor

Figura 5.7: Nitrogênio na forma de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambiente(C)



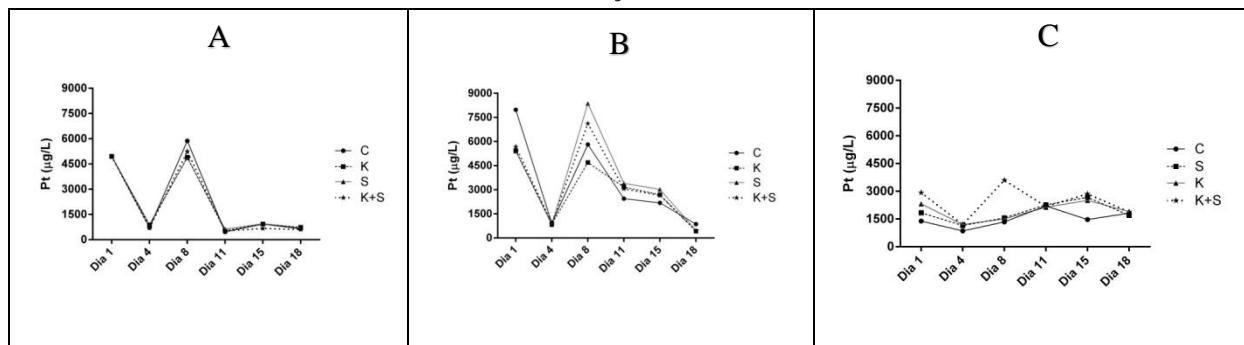
Fonte: O Autor

Figura 5.8: Nitrogênio na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambiente(C)



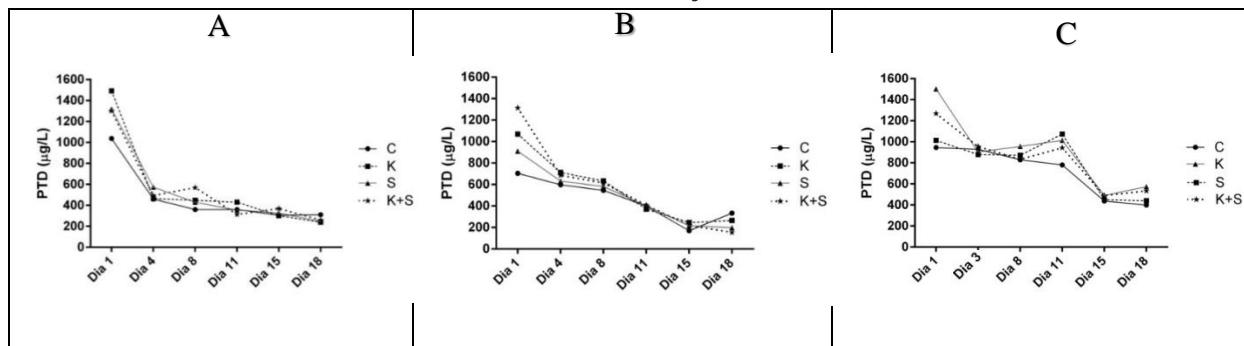
Fonte: O Autor

Figura 5.9: Fósforo total (Pt) presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A), à 33°C (B) e sob condições ambiente (C)



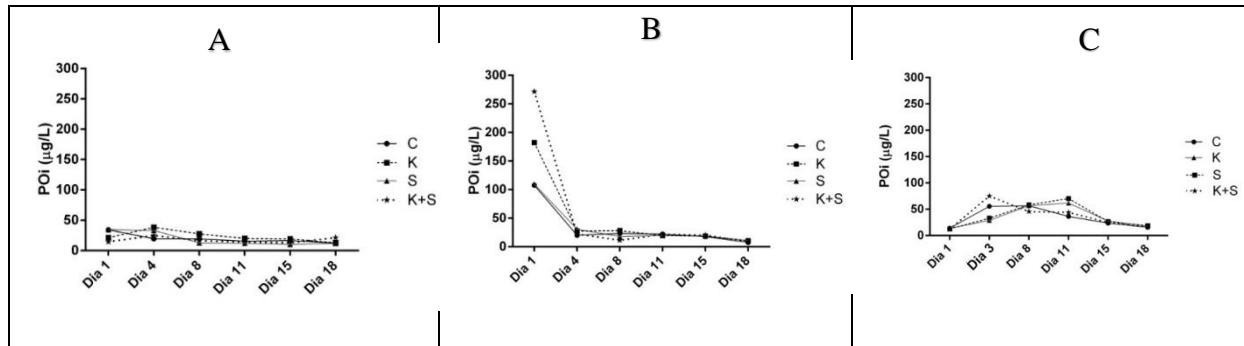
Fonte: O Autor

Figura 5.10: Fósforo total dissolvido (PTD) presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A) e à 33°C (B) e sob condições ambiente (C)



Fonte: O Autor

Figura 5.11: Fosfato inorgânico (POi) presente nas amostras percoladas dos experimentos à 23°C (A) e à 33°C (B) e sob condições ambiente (C)



Fonte: O Autor

Dentre as formas do nitrogênio investigadas, o amoniacal se mostrou o mais heterogêneo em relação ao comportamento dos diferentes tratamentos e o controle, porém, este não é o melhor dos parâmetros para se analisar a mineralização do nitrogênio (WHIETHÖLTER, 2000). O nitrogênio amoniacal vai sendo produzido à medida que a atividade enzimática e metabolismo da microbiota converte os compostos orgânicos mais complexos, ficando em meio aquoso na forma de  $\text{NH}_4^+$ , e se tornando disponível ou sofrendo nitrificação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os microrganismos têm um importante papel no fluxo desses nutrientes, porém, a atividade decompositora dessas comunidades é extremamente dependente de aspectos como clima local, fatores hidrológicos e disponibilidade de fontes de alimentos (PARWEEN, JAN, 2019).

Em relação aos controles, não houve indicação de alterações ocasionadas pelas aplicações do Kraft® na ciclagem do nitrogênio, o que vai de encontro ao estudo de Tentu et al. (2017), que não encontraram diferenças significativas na transformação do nitrogênio de solos contaminados com abamectina, para concentrações de 3,2 e 16 µL de abamectina por kg de solo seco, em relação aos solos controle. Para fungicidas, como é o caso do Score®, é sabido que esse tipo de agrotóxico influencia na nitrificação da ureia e interfere na atividade enzimática da nitrogenase em microrganismos, podendo alterar, portanto, a disponibilidade das espécies nitrogenadas (DI; RODRÍGUEZ, 1997; MARTENS; BREMNER, 1993).

Já o estudo de Filimon et. al (2015) apontou por meio da atividade da enzima urease, que catalisa a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono, que em concentrações inferiores às utilizadas nesse estudo, o difenoconazol, princípio ativo do Score®, é utilizado como fonte de carbono e nitrogênio para alguns microrganismos, podendo reduzir a sua disponibilidade para ser lixiviado. Entretanto, em altas concentrações, o difenoconazol inibe a atividade microbiana.

Além do nitrogênio, o fósforo é outro nutriente limitante para produção primária em ambientes aquáticos, ocorrendo na forma inorgânica como fosfato, enquanto o fosfato orgânico ocorre em ácidos nucleicos e lipídeos. O fosfato pode precipitar na presença de alguns metais, como é o caso do ferro, ou de outros íons como o cálcio (DODDS; WHILES, 2020).

O fósforo foi contabilizado como fósforo total (Pt), o que inclui a sua forma não solubilizada, na forma dos sólidos suspensos, chegando à valores de maiores magnitudes. Já o fósforo total dissolvido (PTD) representa as frações disponíveis em forma solúvel nas soluções de solo, são, portanto mais facilmente carreadas para as amostras.

Bastos (2012), em experimentos em mesocosmos com Vermitec® 18 EC, cujo princípio ativo é também a abamectina, encontrou valores superiores de fósforo inorgânico para os solos contaminados em relação aos controles. Porém, no presente estudo, os agrotóxicos não parecem ter tido esse tipo de interferência.

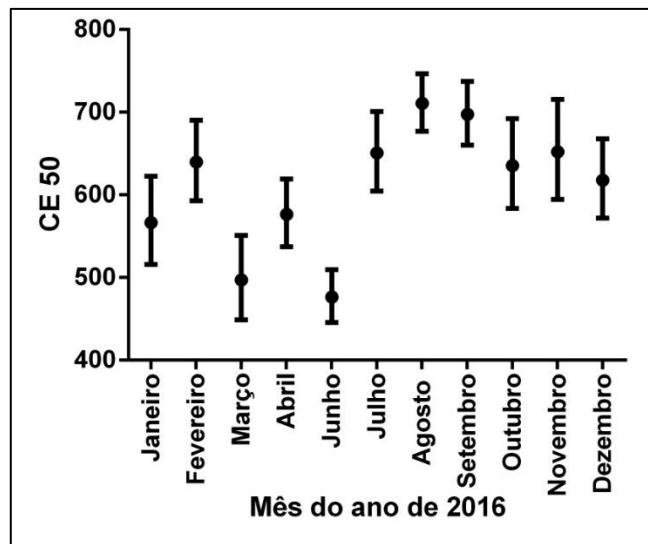
## 5.5 Testes de toxicidade

Conforme estabelecido pela norma ABNT (2016), antes da realização dos testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, realizou-se testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio, para avaliar se as culturas estavam em conformidade para os testes de toxicidade. Os testes de sensibilidade foram realizados durante os anos de 2016 e 2018, período de experimentação com os mesocosmos.

Considerando um intervalo de confiança de 95%, durante o ano de 2016 os valores de  $CE_{50}$  estiveram entre de 445,56 e 746,35 mg/L de cloreto de potássio (Figura 5.12) e durante o ano de 2017 entre 503,7 e 700,85 mg/L de cloreto de potássio (

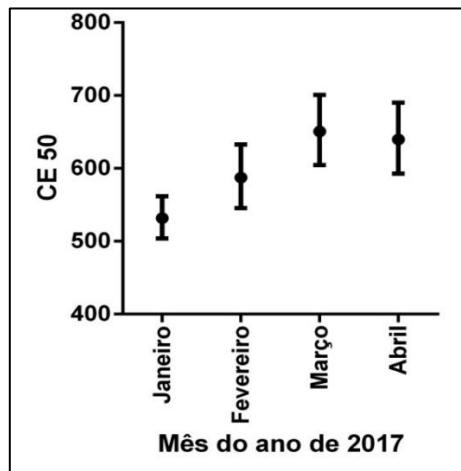
Figura 5.13). Já durante 2018, antes do início dos experimentos em condição ambientais naturais, foi realizado um teste de sensibilidade dos organismos em cultivo, resultado em um valor de 653,92 mg/L de cloreto de potássio, com intervalo de confiança de 95% variando entre 628,57 a 680,30 mg/L.

Figura 5.12: Resultados do teste de sensibilidade de *Daphnia similis* ao cloreto de potássio em mg/L para a Concentração Efetiva na Imobilidade de 50% dos organismos – CE50 (média ± desvio padrão) (Carta controle de 2016)



Fonte: O Autor

Figura 5.13: Resultados do teste de sensibilidade de *Daphnia similis* ao cloreto de potássio em mg/L para a Concentração Efetiva na Imobilidade de 50% dos organismos – CE50 (média ± desvio padrão) (Carta controle de 2017)



Fonte: O Autor

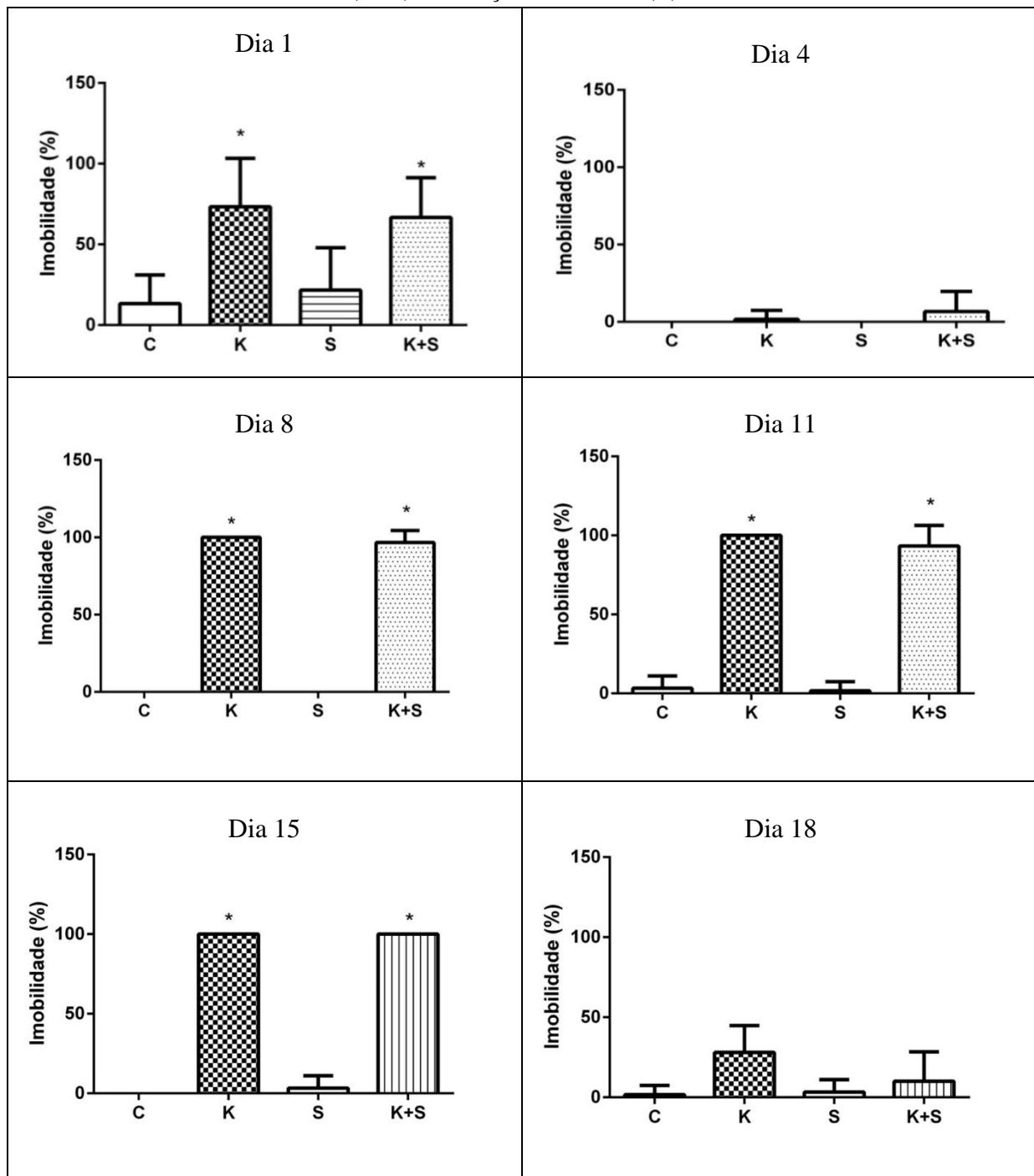
## 5.6 Experimentos em mesocosmos

### 5.6.1 Condições de temperatura controlada

Como critério para as análises dos resultados dos testes de toxicidade, considerou-se efeito tóxico para taxas de imobilidade superiores a 50% dos organismos. Para a condição de temperatura controlada de 23°C, as amostras de percolado provenientes dos mesocosmos tratados com Kraft® e com a mistura binaria Kraft+ Score nos dia em que houveram contaminações por agrotóxicos, ou seja, os dias 1, 8 e 15, apresentaram toxicidade a *Daphnia similis*. Por outro lado, para os dias em que ocorreram somente as simulações de chuvas, o percolado só apresentou toxicidade e percentual de imobilidade significativamente diferente dos mesocosmos controles no dia 11.

As amostras relativas ao tratamento com Score® não apresentaram diferença significativa em relação ao resultado obtido nos mesocosmos controles. Entretanto, nos dias 4 e 18, não houve amostras com toxicidade significativa em relação ao controle (Figura 5.14).

Figura 5.14: Percentuais de imobilidade (média ± desvio padrão) de *D. similis* em resposta aos percolados produzidos nos mesocosmos tratados com os agrotóxicos Kraft (K), Score (S) e a mistura deles (K+S) em relação ao controle (C) à 23°C.



\*  $p < 0,05$  comparada por ANOVA seguida de Dunnett

Fonte: O Autor

Para a condição de temperatura mais elevada, de 33°C, os testes de toxicidade com as amostras de percolado provenientes de todos os mesocosmos (controle, Kraft, Score, Score+Kraft) apresentaram toxicidade no primeiro dia de simulações de chuvas, incluindo para as amostras provenientes dos mesocosmos controle. Ressalta-se que por conta da

variabilidade entre réplicas, para esse dia não foi possível verificar a homogeneidade e normalidade dos dias.

Porém, a partir das amostras do dia 4, não ocorreu taxa significativa de imobilidade dos organismos em relação ao controle laboratorial, conforme pode ser observado na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Pencetuais de imobilidade (média ± desvio padrão) de *D. similis* em resposta aos percolados produzidos nos mesocosmos tratados com os agrotóxicos Kraft (K), Score (S) e a mistura deles (K+S) em relação ao controle (C) à 33°C.

<b>Dia</b>	<b>C</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>K+S</b>
1	60,0±41,8	65,0±28,4	66,7±29,9	66,7±39,4
4	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
8	0,00±0,00	1,67±5,77	0,00±0,00	0,00±0,00
11	1,67±5,77	0,00±0,00	0,00±0,00	1,67±5,77
15	1,67±5,77	8,33±15,86	8,33±13,37	3,33±7,78
18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,33±7,78

Legenda:  Efeito Tóxico

 Efeito não tóxico

Fonte: O Autor

### 5.6.2 Experimentos sob condições ambientais naturais

Experimentos em condições ambientais são suscetíveis a todos os aspectos climáticos locais. Por isso, os dados climatológicos com os registros de pluviometria, temperatura ambiente e da superfície dos tanques são parte imprescindível para a compreensão dos resultados e serão ilustrados abaixo na Figura 5.15 a Figura 5.17.

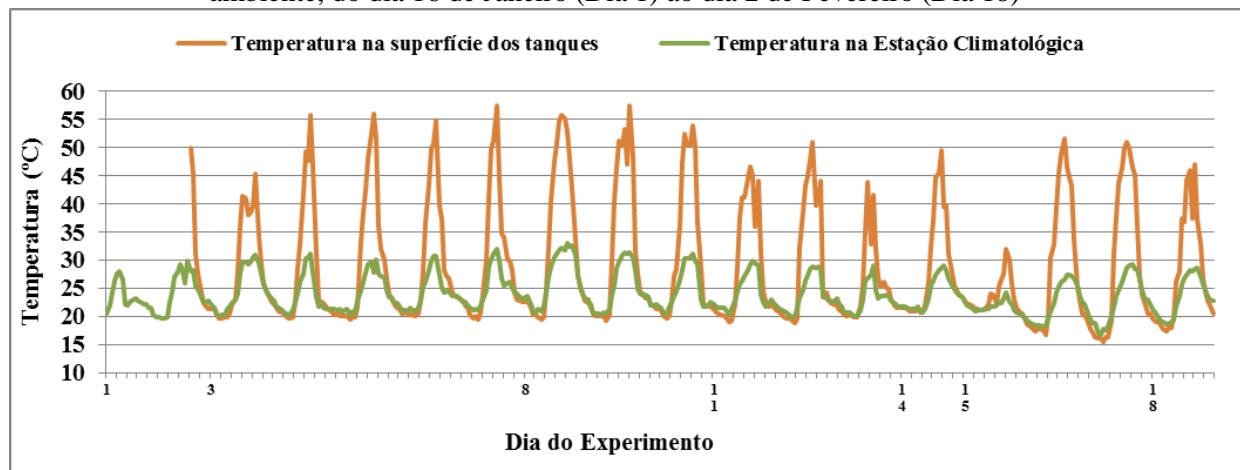
A Figura 5.16 apresenta as precipitações naturais ocorridas durante o experimento, sendo as principais listadas a seguir:

- Entre os dias 1 e 3 ocorreram precipitações, que adicionadas à chuva simulada, influenciaram no volume percolado, que foi coletado no dia 3;
- Entre os dias 8 e 11 ocorreram precipitações de menor intensidade, que apesar de influenciar nas coletas seguintes, não geraram percolado;
- Entre os dias 11 e 14, ocorreu um evento chuvoso que gerou quantidade suficiente de percolado para a realização de testes de toxicidade;
- No dia 15 ocorreu o último episódio de precipitação registrado no período, devido a intensidade do evento, ocorrido durante a simulação de chuva, ao

invés de se utilizar 5 litros de água, foram utilizados apenas 3 litros. O volume de percolado gerado foi superior ao dos outros dias. Nota-se que neste dia ocorreu redução significativa da temperatura ambiente e na superfície do tanque, bem como da intensidade luminosa (Figura 28 e Figura 30).

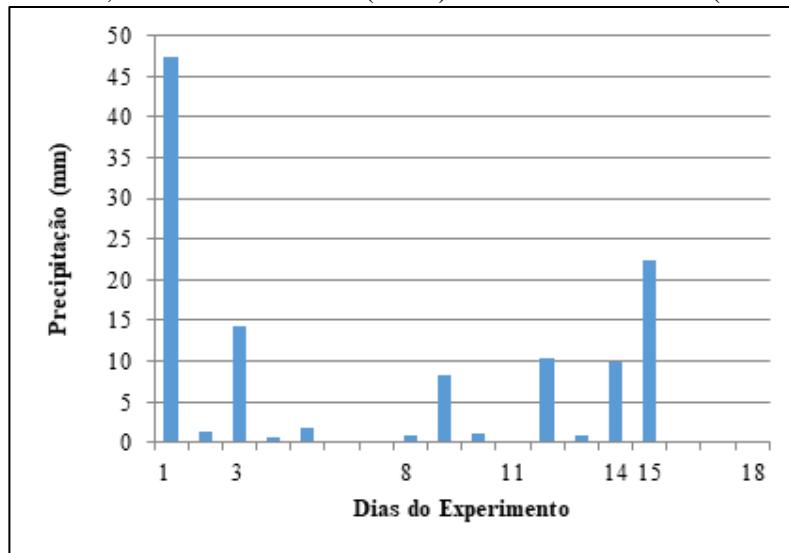
Ao longo do experimento, a temperatura ambiente média foi de 23,78°C, com mínima de 16,07°C e máxima de 32,96°C, enquanto que as temperaturas máxima e mínima atingidas pelo solo foram de 57,53°C e 15,52°C, respectivamente, demonstrando a diferença existente entre as temperaturas atingidas na superfície e no meio do solo, o que pode alterar a degradação do produto (Figura 5.15).

Figura 5.15: Temperaturas, em °C, registradas durante o período de experimentos em condição ambiente, do dia 16 de Janeiro (Dia 1) ao dia 2 de Fevereiro (Dia 18)



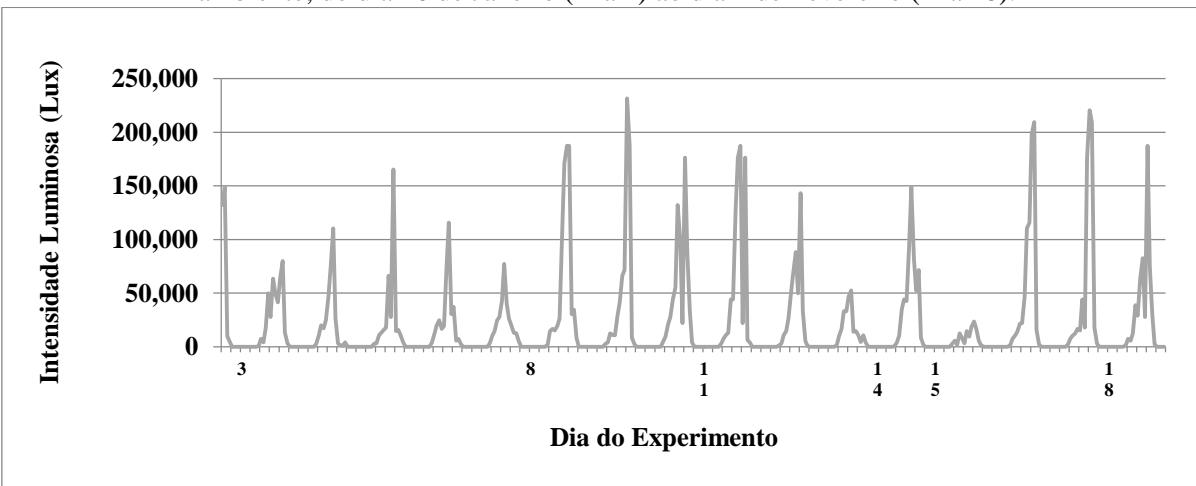
Fonte: O Autor

Figura 5.16: Precipitações, em mm, registradas durante o período de experimentos em condição ambiente, do dia 16 de Janeiro (Dia 1) ao dia 2 de Fevereiro (Dia 18)



Fonte: O Autor

Figura 5.17: Intensidade luminosa, em lux, registrada durante o período de experimentos em condição ambiente, do dia 16 de Janeiro (Dia 1) ao dia 2 de Fevereiro (Dia 18).



Fonte: O Autor

Para os experimentos sob condições ambientais, ao contrário do que foi verificado nos testes em temperatura controlada à 23°C, não foi possível identificar toxicidade dos percolados relacionados ao Kraft®, apresentando resultados análogos aos encontrados nos experimentos sob temperatura controlada à 33°C, como pode ser observado na Tabela 5.5.

No dia 1, similar ao ocorrido sob a condição de temperatura controlada de 33°C, o percolado apresentou toxicidade em todos os tratamentos, incluindo dos tanques controle, com 100% de imobilização aos organismos expostos, porém, ainda no dia 3 algumas réplicas de tratamentos ainda apresentaram toxicidade. Mas, não é possível associar esse efeito tóxico encontrado nos primeiros dias de experimento aos agrotóxicos utilizados.

Tabela 5.5: Percentuais de imobilidade (média ± desvio padrão) de *D. similis* em resposta aos percolados produzidos nos mesocosmos tratados com os agrotóxicos Kraft (K), Score (S) e a mistura deles (K+S) em relação ao controle (C) à condições ambientais naturais

Dia	Imobilidade (%)											
	C1	C2	K1	K2	K3	S1	S2	S3	K+S1	K+S2	K+S3	
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
3	0	5	0	0	60	100	5	100	5	45	0	
8	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	
11	0	0	0	0	45	0	0	35	0	0	0	
14	0	10	0	0	0	5	0	5	5	5	0	
15	5	5	0	0	35	10	0	0	30	0	5	
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	

Legenda:  Efeito Tóxico  
 Efeito não tóxico

Fonte: O Autor

### 5.6.3 A toxicidade do Kraft® e Score® e a influência da temperatura

Os parâmetros físico-químicos encontrados na maior parte dos dias indicaram não causar interferência nos resultados dos testes de toxicidade aguda, sendo que a resultado da toxicidade das amostras produzidas nos mesocosmos controle não indicaram claras relação de causa e efeito. Com exceção de amostras coletadas no dia 1, as quais sob temperaturas mais altas apresentaram toxicidade para os organismos testes. Assim, os nutrientes analisados dão indícios de como está ocorrendo o metabolismo dos microrganismos do solo, sendo ele fortemente variável, dependendo das condições. Portanto, o aumento de temperatura deve produzir alterações nas produções de compostos e da disponibilidade de cada molécula, interferindo no efeito tóxico dos percolados nos organismos teste (SCORZA JÚNIOR; FRANCO, 2013).

Nas diferentes condições de temperatura controlada, 23 e 33°C, foram verificadas diferenças na toxicidade do Kraft ao organismo teste, o cladócero *Daphnia similis*. Sob temperatura controlada mais baixa, à 23°C, nos dias 1, 8 e 15 em que ocorreu aplicação dos agrotóxicos, o percolado produzido pelo tratamento com o Kraft isoladamente e em mistura causou toxicidade, provocando mortalidade ou imobilidade da grande parte dos organismos, sugerindo efeito do princípio ativo ou de metabólitos gerados durante sua degradação.

Com relação aos dias em que só ocorreram as chuvas, o Kraft apresentou persistência entre a segunda e terceira contaminação, com toxicidade aos organismos. Porém, nos dias 4 e 18 do experimento, não ocorreram efeitos tóxicos para o Kraft.

Esse comportamento do agrotóxico na coluna de solo varia de acordo com a composição do meio (SARKAR et al. 2020). A adsorção da abamectina em solos brasileiros foi objeto do estudo de Dionísio e Rath (2016), indicando que a argila e a matéria orgânica contidas nos solos possuem baixa capacidade de promover a dessorção do composto, o que não implica que o processo seja irreversível. Contudo, sob temperatura mais baixa, apesar de o solo conter quantidades relativamente altas de argila e matéria orgânica, por conta da característica de baixo valor de CTC, ainda assim o agrotóxico e seus metabólitos foram lixiviados, indicando efeito tóxico associado ao produto.

Por outro lado, sob temperatura de 33°C e sob condições ambiente, no qual os simuladores foram expostos as condições ambientais durante um dos meses com temperaturas mais elevadas no ano, o Kraft® não apresentou efeito tóxico sobre os organismos, não apresentando diferença significativa em relação aos resultados dos mesocosmos controles, o que indica uma possível degradação do composto ou da produção de metabólitos menos tóxicos. A degradação do princípio ativo do agrotóxico, a abamectina, ocorre principalmente pela ação de microrganismos aeróbios, é o que indica estudos como o de Krogh et al. (2009), que sob condições de anaerobiose verificou que a velocidade de dissipaçao da ivermectina, substância da mesma classe da abamectina, no solo era praticamente constante. O trabalho já citado de Dionísio e Rath (2016) obtém resultados semelhantes, ao verificar que em solos estéreis a abamectina praticamente não se degrada ao longo do tempo, o oposto do que ocorreu em solos não estéreis. Assim, é possível associar o aumento da temperatura com uma aceleração do metabolismo envolvido na degradação do agrotóxico e na produção de subprodutos menos tóxicos, o que também sugere o trabalho de Krogh et al. (2009) quando verificaram um aumento de temperatura, de 6 a 20°C, associado a uma menor disponibilidade da ivermectina.

Além dos tratamentos com Kraft® e Score® individualmente, a aplicação de ambos em mistura, tanto sob condições controladas quanto ambientes, indicou um resultado equivalente ao dos tratamentos com o Kraft® aplicado individualmente, ou seja, em menor temperatura o efeito foi predominantemente tóxico e na maior temperatura não ocorreu efeito tóxico, o que sugere que a toxicidade da mistura é determinada pelo Kraft®. Em contrapartida, Sanches et al. (2017) investigaram os efeitos dos ingredientes ativos dos produtos utilizados no presente trabalho, abamectina e difenoconazol, aplicados individualmente e em mistura, avaliando a letalidade em adultos de *Danio rerio*, encontram CL<sub>50</sub> de 59 µg/L para abamectina e 1,4 mg/L para difenoconazol, quando aplicados em mistura os produtos apresentaram um efeito sinérgico. Também em contraposição aos resultados aqui encontrados, Sanches et al. (2018),

utilizando *D. rerio* em estágios iniciais de vida, encontrou também efeitos sinérgicos entre os compostos puros, abamectina e difenoconazol, em altas doses, entretanto, em doses mais baixas o efeito apresentado foi antagônico.

Os resultados de ausência de toxicidade em alta temperatura (33°C) e em condições ambientais naturais ao serem comparados com toxicidade apresentada nos experimentos realizados sob baixa temperatura (23°C) indicam que o aumento de temperatura implicou na redução de efeito tóxico. A temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes, tanto na regulação fisiológica dos organismos, quanto em seu eventual protagonismo sobre a toxicidade de uma substância, apresentando correlações positivas ou negativas a depender do modo de ação, tipo de organismo e a rota de exposição (ABBES et al., 2015).

Algumas pesquisas também foram realizadas com o intuito de se estudar a influência da temperatura na toxicidade, como é o caso do trabalho de Boina et al. (2009) que investigou a toxicidade de diversos agrotóxicos em hemípteros *Diaphorina citri*, dentre os quais a abamectina, ingrediente ativo do Kraft®, em diferentes condições de temperatura: 17°C, 27°C e 37°. Em contraste aos resultados apresentados aqui anteriormente, o estudo em questão sugere uma correlação positiva entre o aumento de temperatura e a toxicidade da abamectina, representada pelos CL<sub>50</sub> (17°C: CL<sub>50</sub> = 8,60 mg/L; 27°C: CL<sub>50</sub> = 3,67 mg/L; 37°C: 0,48 mg/L). Entretanto, no mesmo artigo, os autores apresentaram correlação negativa entre dois pesticidas da classe dos piretróides e a temperatura, apresentando menores CL<sub>50</sub> para condições de temperatura de 37°C.

Outro estudo, realizado com o inseto *Frankliniella occidentalis* não encontrou uma diferença significativa na sobrevivência dos organismos quando submetidos apenas às diferentes temperaturas (21°C, 26°C e 33°C), porém, quando ocorreu também a exposição ao pesticida avermectina, da mesma classe da abamectina, na dose de 45 mg/L, a sobrevivência foi menor quanto maior a temperatura, sendo que ocorreu redução de aproximadamente metade dos organismos na temperatura mais elevada, indicando um efeito sinérgico desse aspecto ambiental (Li et al., 2014).

A não verificação do aumento de toxicidade com o aumento da temperatura nos resultados aqui presentes pode estar relacionado ao fato da abamectina possuir uma molécula fotodegradável, e como a temperatura tem grande influência sobre a cinética de reações bioquímicas, acelerando-as, pode ter reduzido a sua disponibilidade e de metabólitos mais tóxicos nas amostras. Além disso, grande parte dos estudos submete os organismos diretamente a uma condição mais alta de temperatura enquanto no presente trabalho a

temperatura das amostras foram aclimatadas às mesmas condições de cultivo (DIONÍSIO; RATH,2016; NOYES et al., 2009).

Fungicidas, também podem apresentar uma intensificação de efeitos por meio da temperatura, como discutiram Cuco et al. (2016), que dentre as substâncias estudadas estava o tebuconazol, um triazol, da mesma classe de químicos do difenoconazol, em concentrações no intervalo de 154 a 300  $\mu\text{g/L}$ , com temperaturas variando entre 17 e 23°C, encontraram uma relação positiva de dependência entre temperatura e toxicidade, em que temperaturas mais altas representaram aumento na mortalidade do cladócero *Daphnia lagispina*, utilizado como organismo teste. Entretanto, em nenhuma condição de temperatura o Score® apresentou efeito tóxico nas condições testadas.

Nos testes sob condições ambiental, a maior variabilidade nos valores dos parâmetros pode estar associada à ocorrência de precipitação natural, como a ocorrida no terceiro e nos últimos dias de experimento. Tal fato pode estar associado a uma maior acidez na água precipitada. Por conta do equilíbrio entre o dióxido de carbono da atmosfera e a água precipitada, um processo que ocorre naturalmente, as chuvas podem chegar a valores inferiores a 5, sendo consideradas chuva ácida. Como um caráter ácido das águas da chuva são frequentes, inclusive observadas em regiões não poluídas, tal acidez pode ter contribuído para a liberação de íons no percolado, em oposição à água utilizada nas simulações a qual apresentou caráter básico, com pH superior a 6 (intervalo de 6,11 a 6,69, considerando as amostras que foram medidas durante o experimento) (FORNARO, 2006).

A precipitação de chuva ácida pode implicar em consequências para o solo e os íons nele presentes. A presença de ânions ácidos fortes, como o  $\text{SO}_4^{2-}$  e o  $\text{NO}_3^-$ , facilitam a lixiviação do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , predominando assim íons como  $\text{Al}^{3+}$  (que tem a capacidade de hidrolisar a água reduzindo o pH) e  $\text{H}^+$  no complexo de troca, bem como na solução do solo e na água de drenagem, influenciando diretamente nos parâmetros medidos. Porém, não é fácil identificar se ou quando essa acidificação provém de processos internos do solo ou da chuva ácida. (BRADY; WEIL, 2013).

Já com relação à toxicidade dos agrotóxicos, esta depende da disponibilidade dos contaminantes disponíveis nas soluções que percolaram o solo e ficam suscetíveis. Se por um lado o trabalho de Milhome et al. (2009) indica uma maior possibilidade de contaminação de águas subterrâneas por difenoconazol do que por abamectina em regiões agrícolas, Pinheiro, Moraes e Silva (2011) identificaram com maior frequência fungicidas nas camadas mais superficiais do solo, o que pode indicar uma menor movimentação em direção às águas subterrâneas desse tipo de substância.

Os resultados para o fungicida sistêmico Score<sup>®</sup>, com exceção dos obtidos no dia 1, não apresentaram toxicidade aguda para o organismo teste *D. similis*, independendo das condições de temperatura, que podem sugerir que a concentração presente no percolado está abaixo da concentração com efeito para a espécie.

Apesar dos resultados não tóxicos para o Score<sup>®</sup>, em ambas as temperaturas, vale ressaltar que autores como Mu et. al (2013) obtiveram valores para CL<sub>50</sub> referentes a três fases de desenvolvimento de *Danio rerio*: 1,17 mg/L para fase larval, 1,45 mg/L para a adulta e de 2,34 mg/L para a embrionária, valores que podem ser encontrados no ambiente ou associados a legumes ou frutas em que é comumente utilizado, como o tomate, a depender de práticas incorretas no preparo da calda e aplicação, características ambientais (KONG et al., 2012).

Quanto ao Kraft<sup>®</sup>, cujo princípio ativo é a abamectina, muitos trabalhos sugerem consequências negativas de seu uso para organismos aquáticos. Novelli et al. (2012) encontraram um CE<sub>50</sub> (48 h) para *Daphnia similis* de apenas 5,1 ng abamectina/L, corroborando com a toxicidade expressa para a quantidade utilizada no presente trabalho.

Apesar de os resultados indicarem que sob condições temperaturas elevadas, analisando a partir dos resultados dos dias 3 e 4, não ocorre efeito tóxico dos agrotóxicos nos organismos testados, o conjunto de fatores abióticos e bióticos tornam as interações complexas. As características físicas, químicas e biológicas dos solos são específicas e tais fatores impactam no comportamento dos agrotóxicos, processos de adsorção, lixiviação, entre outros. Além disso, o avanço tecnológico nas plantações, bem como alterações normativas, aumentam a quantidade e diversidade de produtos utilizados, criando novas ameaças podendo alterar comportamento e populações de organismos não alvo, aumentando o grau de suscetibilidade das águas subterrâneas e modificando a ocorrência processos físico-químicos e biológicos, criando novas possibilidades de interação, em que o aumento de temperatura possa interferir na toxicidade dos agrotóxicos, havendo sempre a necessidade de novos estudos. Além disso, vale ressaltar que as culturas de morangos (principais culturas nos quais os compostos estudados são utilizados) são plantadas em áreas com climas mais amenos, o que demonstra o risco ambiental que esses compostos apresentam para os ambientes terrestres e aquáticos.

## 6 Conclusão

O percolado contendo o acaricida Kraft® apresentou toxicidade aguda a 23°C aos organismos-teste *Daphnia similis*, após a realização das contaminações, simulações de chuva e sua percolação nos simuladores, o que demonstra a vulnerabilidade das águas subterrâneas e superficiais e das comunidades associadas. Sob temperaturas mais altas, o percolado apresentou toxicidade apenas no experimento do dia 1, porém, esse resultado se repetiu para todos os tratamentos. Adicionalmente, cabe ressaltar que frequentemente as atividades agrícolas ocorrem em áreas próximas aos mananciais, onde tanto a irrigação quanto eventos chuvosos podem favorecer o carreamento de contaminantes por meio de lixiviação e escoamento superficial.

O percolado do fungicida Score® causou toxicidade aos organismos-teste estudados apenas na chuva ocorrida no dia 1, para as temperaturas mais altas, em ocasiões em que as amostras originadas no mesocosmos controles também apresentaram toxicidade, indicando a não relação com o agrotóxico. Para o restante dos dias de experimentos e nas condições estudadas, porém, não indicaram efeito tóxico do percolado associado ao fungicida.

Os percolados relativos a mistura dos dois agrotóxicos apresentaram resultados análogos aos obtidos com Kraft® aplicado isoladamente, implicando em toxicidade sob temperatura de 23°C e não toxicidade sob temperatura de 33°C e em condições ambientais, indicando que a toxicidade da mistura está diretamente relacionada a toxicidade do Kraft®.

Os testes realizados sob condições ambientais, apesar da grande amplitude térmica, com temperaturas variando entre 16,07°C e 32,96°C apresentou ausência de toxicidade nos experimentos, se aproximando assim do comportamento apresentado sob 33°C, demonstrando a importância da temperatura na toxicidade e comportamento desses compostos.

Por fim, aspectos como o tipo e composição do solo, clima, umidade ou regime pluviométrico, o tipo de organismo utilizado nos ensaios, podem resultar em efeitos distintos, sendo necessários novos estudos avaliando outros tipos de cenário.



## Referências

- ABBES, K.; BIONDI, A.; KURTULUS, A.; RICUPERO, M.; RUSSO, A.; SISCARO, G.; CHERMITI, B.; ZAPPALÀ, L. Combined non-target effects of insecticide and high temperature on the parasitoid *Bracon nigricans*. **PLoS One**, v.10, n.9, e0138411, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138411>.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for examination water and wastewater**. 19<sup>th</sup>ed. Washington, DC, 1995.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for examination water and wastewater**. 21<sup>st</sup>ed. Washington, DC, 2005.
- ANDERSEN, J. M. An Ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. **Water Research**, v. 10, p. 329-331, 1976.
- ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. 2ed. Brasil: RIMA, 2008. Cap. 6, p. 117-152.
- ARIAS-ESTÉVEZ, M.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J.; MEJUTO, J.C.; GARCÍA-RÍO, L. The Mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 123, p. 247–260, 2008.
- ARTIGAS, J.; ARTS, G.; BABUT, M.; CARACCIOLI, A. B.; CHARLES, S.; CHAUMOT, A.; COMBOURIEU, B.; DAHLLÖF, I.; DESPRÉAUX, D.; FERRARI, B.; FRIBERG, N.; GARRIC, J.; GEFFARD, O.; GOURLAY-FRANCÉ, C.; HEIN, M.; HJORTH, M.; KRAUSS, M.; DE LANGE, H. J.; LAHR, J.; LEHTONEN, K. K.; LETTIERI, T.; LIESS, M.; LOFTS, S.; MAYER, P.; MORIN, S.; PASCHKEM, A.; SVENDSE, C.; USSEGLIO-POLATERA, P.; VAN DEN BRINK, N.; VINDIMIANE, J.; WILLIAMS, R. Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. **Environmental Pollution**, v. 160, p.201-206, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713** - Toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181** - Solo - análise granulométrica. Rio de Janeiro, 1988.
- BASTOS, M. M. **Avaliação da toxicidade do agrotóxico Vertimec® 18 EC em organismos aquáticos em mesocosmos com diferentes características nutricionais**. 2010. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- BELDEN, J. Introduction to ecotoxicology. In: POPE, C.; LIU, J. (Ed.). **An Introduction to interdisciplinary toxicology**. New York: Academic Press, 2020. p. 381-393.

BELL, M.L.; GOLDBERG, R.; HOGREFE, C.; KINNEY, P.L.; KNOWLTON, K.; LYNN, B.; ROSENTHAL, J.; ROSENZWEIG, C.; PATZ, J.A. Climate change, ambient ozone, and health in 50 US cities. **Climatic Change**, v. 82, p. 61–76, 2007.

BIDWELL, J. R. In vivo ecotoxicology models. In: POPE, C.; LIU, J. (Ed.). **An Introduction to interdisciplinary toxicology**. New York: Academic Press, 2020. p. 507-523,

BOINA, D. R.; ONAGBOLA, E. O.; SALYANI, M.; STELINSKI, L. L. Influence of posttreatment temperature on the toxicity of insecticides against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n.2, p. 685-691, 2009.

BRADY, N.; WEIL, R. Acidez, alcalinidade, aridez e salinidade do solo. In: BRADY, N.; WEIL, R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. 3.ed. São Paulo: Bookman, 2013. p. 298-355.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução Conama nº 357, 18 de março de 2005**. Dispõe sobre padrão de qualidade de água e emissão de poluentes. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/conama/>. Acesso em: 5 jan. 2016.

BRASIL. Lei n. 7.802/89, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 12 jul. 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Informações técnicas**. Registros concedidos – 2005 – 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>. Acesso em: 20 set. 2020.

CARNIEL, L.S.C.; NIEMEYER, J.C.; OLIVEIRA FILHO, L.C.I.; ALEXANDRE, D.; GEBLER, L.; KLAUBERG-FILHO, O. The Fungicide mancozeb affects soil invertebrates in two subtropical Brazilian soils. **Chemosphere**, v. 232, p.180-185, 2019.

CARVALHO, M.M.X.D.; NODARI, E.S.; NODARI, R.O. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 24, n. 1, p. 75-91, 2017.

CASALI-PEREIRA, M. P.; DAAM, M. A., DE RESENDE, J. C.; VASCONCELOS, A. M.; ESPÍNDOLA, E. L.; BOTTA, C. M. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v. 139, p. 558-564, 2015.

CEREZER, C.; MARINS, A. T.; CEREZER, F. O.; SEVERO, E. S.; LEITEMPERGER, J. W.; BANDEIRA, N. M. G.; SANTOS, S. Influence of pesticides and abiotic conditions on biochemical biomarkers in *Aegla* aff. *longirostris* (crustacea, anomura): implications for

conservation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, 2020. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110982.

CHELINHO, S.; LOPES, I.; NATAL-DA-LUZ, T.; DOMENE, X.; TENORIO NUNES, M. E; ESPÍNDOLA, E. L. G.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. Integrated ecological risk assessment of pesticides in tropical ecosystems: a case study with carbofuran in Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 437-445, 2012.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CUCO, A. P.; ABRANTES, N.; GONÇALVES, F.; WOLINSKA, J.; CASTRO, B. B. Toxicity of two fungicides in Daphnia: is it always temperature-dependent?. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 7, p. 1376-1389, 2016.

DE BEECK, L.; VERHEYEN, J.; OLSEN, K.; STOKS, R. Negative effects of pesticides under global warming can be counteracted by a higher degradation rate and thermal adaptation. **Journal of Applied Ecology**, v. 54, n. 6, p. 1847-1855, 2017.

DELNAT, V.; TRAN, T. T.; JANSSENS, L.; STOKS, R. Daily temperature variation magnifies the toxicity of a mixture consisting of a chemical pesticide and a biopesticide in a vector mosquito. **Science of The Total Environment**, v. 659, p. 33-40, 2019.

DI, C. C.; RODRÍGUEZ, E. C. Effect of the fungicide captan on *Azospirillum brasiliense* Cd in pure culture and associated with *Setaria italica*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 29, n. 3, p. 152-156, 1997.

DIONISIO, A. C.; RATH, S. Abamectin in soils: analytical methods, kinetics, sorption and dissipation. **Chemosphere**, v. 151, p. 17-29, 2016.

DODDS, W. K.; WHILE, M. R. Responses to stress, toxic chemicals, and other pollutants in aquatic ecosystems. In: DODDS, W. K.; WHILE, M. R. (Ed.). **Freshwater ecology**. 3<sup>th</sup>.ed. New York: Academic Press, 2010. Cap. 16, p. 399-436.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. 2.ed. São Carlos: RIMA, 2008. Cap. 7, p. 153-184.

DUSO, C.; VAN LEEUWEN, T.; POZZEBON, A. Improving the compatibility of pesticides and predatory mites: recent findings on physiological and ecological selectivity. **Current Opinion in Insect Science**, v. 39, p. 63-68, 2020.

EMBRAPA. **Guia prático para interpretação de resultados de análises de solo**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 206).

FIGUEIRÊDO, L. P.; ATHAYDE, D. B.; DAAM, M. A.; VAN GESTEL, C. A.; SILVA GUERRA, G.; DUARTE-NETO, P. J.; ESPÍNDOLA, E. L. 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, 2020. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110446.

FILIMON, M. N.; VORIA, S. O.; VLADOIU, D. L.; ISVORAN, A.; OSTAFE, V. Temperature dependent effect of difenoconazole on enzymatic activity from soil. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 80, n. 9, p. 1127-1137, 2015.

FISHER, M.H.; MROZIK, H. Chemistry. *In: CAMPBELL, W. Ivermectin and abamectin.* Berlin: Springer Verlag, 1989. Cap 1, p. 1-23.

FORNARO, A. Águas de chuva: conceitos e breve histórico. Há chuva ácida no Brasil?. **Revista USP**, n. 70, p. 78-87, 2006.

HALL, K. E.; RAY, C.; KI, S. J.; SPOKAS, K. A.; KOSKINEN, W. C. Pesticide sorption and leaching potential on three Hawaiian soils. **Journal of Environmental Management**, v. 159, p. 227-234, 2015.

HALLEY, B. A.; VANDENHEUVEL, W. J. A.; WISLOCKI, P. G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 48, p. 109-125, 1993.

HARRIS, G. L.; FORSTER, A. Pesticides contamination of surface waters: the potential role of buffer zones. *In: HAYCOCK, N. E.; BURT, T. P.; GOULDING, K. W. T.; PINAY, G. (Ed.). Buffer zones: their processes and potential in water protection.* Harpenden: Quest Environmental, 1996. p. 62-69.

HESS, T.; ALDAYA, M.; FAWELL, J.; FRANCESCHINI, H.; OBER, E.; SCHAUB, R. Understanding the impact of crop and food production on the water environment--using sugar as a model. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 94, p. 2-8, 2014.

HODGSON, E.; WALLACE, A. D. Human metabolic interactions of pesticides: inhibition, induction, and activation. *In: KNAAK, J. B.; TIMCHALK, C.; TORNERO-VELEZ, R. Parameters for Pesticide QSAR and PBPK/PD Models for Human Risk Assessment.* Washington: ACS, 2012. Cap. 8, p. 115-132. (ACS Symposium Series, 1099).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Perfil dos municípios brasileiros.** Pesquisa de informações básicas municipais. Meio ambiente 2002. Rio de Janeiro, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS E RENOVÁVEIS. **Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins:** histórico de vendas – 2000 a 2012. Brasília: Ibama – Sede, 2013. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 30 set. 2020.

IPCC. **Global Warming of 1.5°C.** An IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5 °C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. 2018.

IPCC. Climate Change and Land: An IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. 2019. In: **The approved Summary for Policymakers (SPM) was presented at a press conference on**. 2019.

ITURBURU, F.G.; CALDERON, G.; AMÉ, M.V.; MENONE, M.L. Ecological risk assessment (ERA) of pesticides from freshwater ecosystems in the Pampas region of Argentina: Legacy and current use chemicals contribution. **Science of The Total Environment**, v. 691, p. 476-482, 2019.

JACQUIN, L.; GANDAR, A.; AGUIRRE-SMITH, M.; PERRAULT, A.; LE HÉNAFF, M.; DE JONG, L.; JEAN, S. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, p. 255-264, 2019.

JONES, S. J.; LASSITER, M. G. Environmental toxicology: aquatic. In: WEXTER, P. (Ed.). **Information resources in toxicology**. 5<sup>th</sup>ed. New York: Academic Press, 2020. p. 263-278.

KONG, Z. Q.; DONG, F. S. ; XU, J.; LIU, X. J.; ZHANG, C. P.; LI, J. ; CHEN, X. ; SHAN, W. L.; ZHENG, Y. Q. Determination of difenoconazole residue in tomato during home canning by UPLC-MS/MS. **Food Control**, v. 23, p. 542-546, 2012.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSOHOFF, K. (ed.). **Methods of seawater analysis**. Weinhein: Verlag Chemie, 1976. p. 117-181.

KROGH, K. A.; JENSEN, G. G.; SCHNEIDER, M. K.; FENNER, K.; HALLING-SØRENSEN ,B. Analysis of the dissipation kinetics of ivermectin at different temperatures and in four different soils. **Chemosphere**, v. 75, n. 8, p. 1097-1104, 2009.

LAETZ, C. A.; BALDWIN, D. H.; HEBERT, V. R.; STARK, J. D.; SCHOLZ, N. L. Elevated temperatures increase the toxicity of pesticide mixtures to juvenile coho salmon. **Aquatic Toxicology**, v. 146, p. 38-44, 2014.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida**. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1997. Apostila .

LAVORGNA, M.; RUSSO, C.; D'ABROSCA, B.; PARRELLA, A.; ISIDORI, M. Toxicity and genotoxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride (BAC) using *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* as model systems. **Environmental Pollution**, v. 210, p. 34-39, 2016.

LEITÃO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; VAN DEN BRINK, P. J.; RIBEIRO, R.; CEREJEIRA, M. J.; SOUSA, J. P. Ethoprophos fate on soil-water interface and effects on non-target terrestrial and aquatic biota under Mediterranean crop-based scenarios. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 103, p. 36–44, 2014.

LI, H. B.; ZHENG, Y. T.; SUN, D. D.; WANG, J. J.; DU, Y. Z. Combined effects of temperature and avermectins on life history and stress response of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 108, p. 42-48, 2014.

LIU, J.; POPE, C. N. Intrinsic and extrinsic factors that can modify toxicity. In: POPE, C.; LIU, J. (Ed.). **An Introduction to interdisciplinary toxicology**. New York: Academic Press, 2020. p. 285-293.

LOPES, A. S. **Manual de fertilidade do solo**. São Paulo: ANDA/POTAFOS, 1989.

LOPES, N. P.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; ZAMBOLM, L. Influência da matéria orgânica na adsorção do fungicida triadimenol pelo solo. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 544-547, 2002.

LUZZI, N. **O Debate agroecológico no Brasil**: uma construção a partir de diferentes atores sociais. 2007. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Humanas e Sociais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <http://r1.ufrrj.br/cpda/dissertacoes-e-teses/doutorado-2007/>. Acesso em: 5 mar. 2016.

MACKERETH, S.J.H.; HERON, J.; TALLINNG, J.S. **Water analysis some revised methods for limnology**. Ambleside: Freshwater Biological Association Scientific Publication, 1978.

MARTENS, D. A.; BREMNER, J. M. Influence of herbicides on transformations of urea nitrogen in soil. **Journal of Environmental Science & Health Part B**, v. 28, n. 4, p. 377-395, 1993.

MATTOS, M.; OLIVEIRA, J.; HAJI, F.; LIMA, M.; COSTA, N. Avaliação de estratégias com agroquímicos no controle de Bemisia argentifolii Bellows & Perring (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomate. **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 12, p. 131-144, 2002.

MILHOME, M. A. L.; SOUSA, D. O. B.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. 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, n. 3, p. 363-372, 2009.

MONTEIRO, R.T.R.; FRIGHETTO, R.T.S. Determinação da umidade, pH e capacidade de retenção de água do solo. In: FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 37-40.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: UFLN, 2009.

MOREIRA, R. A.; DAAM, M. A.; VIEIRA, B. H.; SANCHES, A. L. M.; REGHINI, M. V.; SILVA MANSANO, A; ROCHA, O. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58-66, 2017.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. 2.ed. São Carlos: RIMA, 2008. Cap. 2, p. 15-38.

MU, X.; PANG, S.; SUN, X.; GAO, J.; CHEN, J.; CHEN, X.; WANG, C. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 147-157, 2013.

NOVELLI, A.; VIEIRA, B. H.; CORDEIRO, D.; CAPPELINI, L. T. D.; VIEIRA, E. M.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 36-40, 2012.

NOYES, P. D.; MCELWEE, M. K.; MILLER, H. D.; CLARK, B. W.; VAN TIEM, L. A.; WALCOTT, K. C.; ERWIN, K. N.; LEVIN, E. D. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. **Environment International**, v. 35, p. 971-986, 2009.

NUNES, M.E.T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com Eisenia andrei (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural do solo.** 2010. Tese (Doutorado) –Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

NUNES, M. E. T.; ESPINDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, p.1063-107, 2012.

OLIVEIRA, A. B. Avaliação do ciclo de vida de cenários de logística reversa de embalagens de agrotóxicos no Brasil. 2019. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho”, Bauru, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/183494>. Acesso em: 30 set. 2020.

OLIVEIRA, J. B.; PRADO, H. **Levantamento pedológico semidetalhado do Estado de São Paulo:** quadricula de São Carlos-SP. Memorial Descritivo e Cartas de Solos. Campinas: IAC, 1984. (Boletim Técnico, 98).

PARWEEN, T.; JAN, S. **Ecophysiology of pesticides:** interface between pesticide chemistry and plant physiology. New York: Academic Press, 2019.

PINHEIRO, A.; MORAES, J. C.; SILVA, M. R. D. Pesticidas no perfil de solos em áreas de plantação de cebolas em Ituporanga, SC. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 5, p. 533-538, 2011.

PINTO, L. F. G.; CRESTANA, S. Características edafoclimáticas e informações socioeconômicas no diagnóstico de agroecossistemas da região de São Carlos, SP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.**, v. 36, n. 11, p. 1325-1329, 2001.

RODRIGUES, D. O. ; SILVA, S. L. R.; SILVA, M. D. S. R. Avaliação ecoloxicológica preliminar das águas das bacias hidrográficas dos rios Tarumã, São Raimundo e Educandos. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 935-942, 2009.

RONCO, A.; BAÉZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Conceptos generales. In: CASTILLO, G. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas:** estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Mexico: IMTA, 2004. Cap. 1, p. 17-22.

RONQUIM, C. C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais.** Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. (Embrapa Monitoramento por Satélite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8).

SANCHES, A. L. M. **Avaliação do efeito ambiental do inseticida Kraft 36EC®(abamectina) e do fungicida Score 250EC®(difenoconazol) por meio de análises ecotoxicológicas em diferentes estágios de vida do Danio rerio.** 2018. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

SANCHES, A. L. M.; VIEIRA, B. H.; REGHINI, M. V.; MOREIRA, R. A.; FREITAS, E. C.; ESPÍNDOLA, E. L.; DAAM, M. A. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, p. 582-587, 2017.

SANCHES, A. L. M.; DAAM, M. A.; FREITAS, E. C.; GODOY, A. A.; MEIRELES, G.; ALMEIDA, A. R.; DOMINGUES, I.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Lethal and sublethal toxicity of abamectin and difenoconazole (individually and in mixture) to early life stages of zebrafish. **Chemosphere**, v. 210, p. 531-538, 2018.

SARKAR, B.; MUKHOPADHYAY, R.; MANDAL, A.; MANDAL, S.; VITHANAGE, M.; BISWAS, J. K. Sorption and desorption of agropesticides in soils. In *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation* (pp. 189-205). Butterworth-Heinemann, 2020.

SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 41, n. 8, p. 1417-1430, 2006.

SCORZA JÚNIOR, R. P.; FRANCO, A. A. A temperatura e umidade na degradação de fipronil em dois solos de Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1203-1209, 2013.

SHARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 41, p. 1417-1430, 2006.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Agrotóxicos & ambiente.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

SILVA, D. R. O.; DE AVILA L. A.; AGOSTINETTO, D.; BUNDT, A. D. C.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S. Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 748-752, 2011.

SILVA, L. C.; DAAM, M. A.; GUSMAO, F. Acclimation alters glyphosate temperature-dependent toxicity: Implications for risk assessment under climate change. **Journal of Hazardous Materials**, v. 385, 2020. DOI: doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121512.

SIMON-DELSO, N.; V. AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, F.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C. H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A. D.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VANPRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J. P.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5-34, 2015.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. S. Estimating the social cost of pesticide use: an assessment from acute poisoning Brazil. **Ecological Economics**, v. 68, p. 2721-2728, 2009.

SOUZA, S. B. D.; FERREIRA JUNIOR, L. G.; MIZIARA, F.; MORAIS, H. A. D. Crédito rural no Brasil: evolução e distribuição espacial (1969–2016). **Confins: revue franco-brésilienne de géographie/Revista franco-brasileira de geografia**, n. 45, May 2020. DOI: 10.400/confins.29836.

SPADOTTO, C. A.; SCORZA JUNIOR, R. P.; DORES, E. F. G. C.; GEBLER, L.; MORAES, D. A. C. **Fundamentos e aplicações de modelagem ambiental de agrotóxicos**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. (Documentos, v.78).

SYNGENTA. **Ficha de dados de segurança de acordo com regulamento (CE) nº 1907/2006.** SCORE 250 EC, 2011. Disponível em: [http://www.jovagro.pt/sites/default/files/Score250EC\\_Ficha\\_de\\_Seguranca.pdf](http://www.jovagro.pt/sites/default/files/Score250EC_Ficha_de_Seguranca.pdf). Acesso em: 10 mar. 2016.

TARAZONA, J. V.; DOHMEN, G. P. Ecotoxicology of rice pesticides. In: CAPRI, E.; KARPOUZAS, D. (Ed.). **Pesticide risk assessment in rice paddies**: theory and practice. New York: Elsevier, 2008. Cap. 5, p. 69-90.

TENTU, N. R.; BOTSA, P.; TENTU, M. N.; APPARAO, K. Soil microorganisms nitrogen transformation test for abamectin 3.6 g/L EC (w/v) in loamy sand soil. **Acta Ecologica Sinica**, v. 37, n. 2, p. 115-119, 2017.

TRINDADE, M. Nutrientes em sedimento da represa do Lobo (Brotas-Itirapina, SP). 1980. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1980.

VAN DEN BRINK, P.J., BOXALL, A.B.A., MALTBY, L., BROOKS, B.W., RUDD, M.A., BACKHAUS, T., SPURGEON, D., VEROUGSTRAETE, V., AJAO, C., ANKLEY, G.T., APITZ, S.E., ARNOLD, K., BRODINT, FORD, A.T., GIM, G., LOUTSETI, S., MARSHALL, S., MUIR, D., ORTIZ-SANTALIESTRA, M.E., PAUL, K.B., RICO, A., RODEA, I. Toward sustainable environmental Quality: priority research questions for Europe. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 9, p. 2281-2295, 2018. DOI: 10.1002/etc.4205. Epub 2018 Jul 19.

VASSEUR, D. A.; DELONG, J. P.; GILBERT, B.; GREIG, H. S.; HARLEY, C. D.; MCCANN, K. S.; O'CONNOR, M. I. Increased temperature variation poses a greater risk to species than climate warming. **Proceedings of the Royal Society B: biological sciences**, v. 281, n. 1779, 2014. DOI: 10.1098/rspb.2013.2612.

VERHEYEN, J.; STOKS, R. Current and future daily temperature fluctuations make a pesticide more toxic: contrasting effects on life history and physiology. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 209-218, 2019.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. Inorganic nutrients: nitrogen, phosphorus, and other nutrients. In: WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. Limnological analyses. New York: Springer, 1991. p. 81-105.

WHIETHÖLTER, S. Nitrogênio no solo sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, p.38-42, 2000.

WU, C.; LUO, Y.; GUI, T.; HUANG, Y. Concentrations and potential health hazards of organochlorine pesticides in shallow groundwater of Taihu Lake region, China. **Science of the Total Environment**, n. 470-471, p.1047-1055, 2014. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.056.

WU, S.; LEI, L.; LIU, M.; SONG, Y.; LU, S.; LI, D.; SHI, H.; RALEY-SUSMAN, K. M.; HE, D. Single and mixture toxicity of strobilurin and sdhi fungicides to xenopus tropicalis embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety** , v. 153, p. 8–15, 2018.

ZELIGER, H. I. **Human toxicology of chemical mixtures**: toxic consequences beyond the impact of one-component product and environmental exposures. New York: William Andrew, 2008. p. 213-228.