

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

**FRANCISCO JOSÉ AVESANI FILHO**

**Agrotóxicos em riachos de pequena ordem no município de São Carlos (SP):  
ocorrência ambiental e ensaios de ecotoxicidade**

**São Carlos (SP)**  
**2021**



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

FRANCISCO JOSÉ AVESANI FILHO

**Agrotóxicos em riachos de pequena ordem no município de São Carlos (SP):  
ocorrência ambiental e ensaios de ecotoxicidade**

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

Orientador: Davi Gasparini Fernandes Cunha

**São Carlos (SP)**

**2021**

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).

Avesani Filho, Francisco José  
A948a Agrotóxicos em riachos de pequena ordem no  
município de São Carlos (SP): ocorrência ambiental e  
ensaios de ecotoxicidade / Francisco José Avesani  
Filho; orientador Davi Gasparini Fernandes Cunha. São  
Carlos, 2021.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --  
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de  
São Paulo, 2021.

1. Ácido diclorofenóxiacético (2,4-D). 2.  
Ensaios ecotoxicológicos. 3. Pesticidas. 4.  
Raphidocelis subcapitata. 5. Riachos de cabeceira. I.  
Título.

# FOLHA DE JULGAMENTO

---

Candidato(a): **Francisco José Avesani Filho**

Data da Defesa: 20/08/2021

Comissão Julgadora:

Resultado:

**Davi Gasparini Fernandes Cunha (Orientador(a))**

a p r o v a d o

**Juliano José Corbi**

a p r o v a d o

**Raquel Aparecida Moreira**

a p r o v a d o



**Prof. Dr. Marcelo Zaiat**

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha mãe Tatiana e  
ao meu pai Francisco, por todo apoio durante  
minha formação pessoal e profissional



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador de iniciação científica e professor Davi, por toda disponibilidade e prontidão durante todo período de realização deste trabalho e ensinamentos durante a graduação. Além disso, sou muito grato por toda sua dedicação e paciência em me ensinar tudo ao longo deste caminho, que fez me evoluir como muito como acadêmico e pessoa.

Aos membros da banca avalidora deste trabalho de graduação, Juliano e Raquel, por todo tempo dedicado e pelos seus comentários e sugestões, que foram de grande importância para composição este projeto.

À minha mãe e ao meu pai por todo suporte e ensinamentos durante todas etapas de minha vida.

À Aline, que desde o início foi extremamente importante para o desenvolvimento deste trabalho, e sempre esteve disposta em me ajudar durante todo horizonte de projeto. E também por me acompanhar durante o caminho, sendo toda a sua ajuda e paciência fundamentais para desenvolvimento desta pesquisa.

Ao pessoal do BIOTACE, por toda ajuda durante as atividades de laboratórios e pelas boas conversas.

Aos meus amigos de Campo Grande, que sempre foram grandes parceiros durante toda a vida, e sempre me apoiaram e me fizeram ser uma pessoa melhor.

À toda turma 016 da ambiental que me proporcionou muitas alegrias e momentos únicos durante minha graduação em São Carlos. Foram anos de muito aprendizado e experiencias inesquecíveis, que vou carregar em minha memória para sempre.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de iniciação científica.

*“O impossível existe até que  
alguém duvide dele e prove  
o contrário.”*

Albert Einstein

## RESUMO

Avesani Filho, Francisco José. **Agrotóxicos em riachos de pequena ordem no município de São Carlos (SP): ocorrência ambiental e ensaios de ecotoxicidade.** 2021. 73 f.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Curso de Engenharia Ambiental, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Embora o Brasil seja um país privilegiado em relação à disponibilidade hídrica, sua distribuição assimétrica em território nacional e o comprometimento dos seus aspectos qualitativos dos cursos de água têm impostos desafios significativos. Os sistemas aquáticos estão sujeitos a diversos impactos vinculados às atividades antrópicas, que têm ocasionado prejuízo aos serviços ecossistêmicos. A atividade agrícola tem crescido de forma exponencial no Brasil nas últimas décadas, em especial culturas de cana-de-açúcar no estado de São Paulo, e pode ocasionar diversos impactos ambientais (processos erosivos, desmatamento, perda de nutrientes do solo e degradação da qualidade da água). Sabe-se que no estado de São Paulo tem crescido o consumo de agrotóxicos desde o século passado, com um significativo aumento destes produtos comercializados nos últimos anos. O disseminado uso de agrotóxicos na agricultura é outro impacto associado às culturas de cana que pode causar a contaminação de águas adjacentes aos cultivos e causar efeitos adversos à biota aquática. O objetivo principal dessa pesquisa foi analisar a ocorrência de alguns agrotóxicos e outros parâmetros de qualidade da água em riachos localizados em microbacias com diferentes formas de uso e ocupação do solo em São Carlos (SP). Para isso, foram realizadas coletas de água em sete riachos de pequena ordem no município de São Carlos, quantificando 16 agrotóxicos, além da realização de testes ecotoxicológicos. O estudo de ecotoxicidade à microalga *Raphidocelis subcapitata* foi conduzido com amostras de água e o ingrediente ativo do herbicida 2,4-D, que foi escolhido para os testes por ter sido o mais prevalente nas amostras ambientais. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 500  $\text{ng L}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 5  $\text{mg L}^{-1}$ , 50  $\text{mg L}^{-1}$  e 100  $\text{mg L}^{-1}$ . Os ensaios mostraram que apenas as concentrações de 50mg  $\text{L}^{-1}$  e 100mg  $\text{L}^{-1}$  inibiram de forma significativa o crescimento da microalga *Raphidocelis Subcapitata*, com um  $IC_{50-196h}$  de 29,4  $\text{mg L}^{-1}$ . As formas de uso e ocupação em cada microbacia interferiram diretamente na ocorrência de agrotóxicos nos riachos estudados, de modo que aqueles situados em bacias com maiores áreas de mata ciliar e reserva legal apresentaram menores ocorrências de agrotóxicos. Por fim, devido ao excessivo uso de agrotóxicos e a crescente detecção destes compostos em ambientes aquáticos, destaca-se a importância de aliar ensaios de ecotoxicidade e análises de ocorrências ambiental de tais compostos com vistas a subsidiar a melhor compreensão dos riscos ambientais a eles associados.

**Palavras-chave:** Ácido diclorofenóxiacético (2,4-D); Ensaios ecotoxicológicos; Agrotóxicos; *Raphidocelis subcapitata*; Riachos de cabeceira.

## ABSTRACT

Avesani Filho, Francisco José. **Pesticides in small order streams in São Carlos, São Paulo: environment occurrence and toxicity tests.** 2021. 73 f. Monografia – Curso de Engenharia Ambiental, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Although Brazil is a privileged country in terms of water availability, its unequal distribution across the national territory and the compromise of the qualitative aspects of the water courses have been posing significant challenges. Aquatic systems are subject to several impacts linked to human activities, which have caused damage to ecosystem services. Agricultural activity has grown exponentially in Brazil in recent decades, especially sugarcane crops in the state of São Paulo, and can cause various environmental impacts (erosive processes, deforestation, loss of soil nutrients and quality degradation from water). It is known that in the state of São Paulo the consumption of pesticides has increased since the last century, with a significant increase in these compounds sold in recent years. The widespread use of pesticides in agriculture is another impact associated with sugarcane crops that can cause contamination of water adjacent to crops and adversely affect aquatic biota. The aim of this research was to analyze the occurrence of some agrochemicals and other water quality parameters in streams located in watersheds with different forms of land use in São Carlos (SP, Brazil). For this purpose, samplings were carried out in seven small streams in this city, quantifying 16 pesticides, in addition to carrying out ecotoxicological tests. The ecotoxicity study to the microalgae *Raphidocelis subcapitata* was conducted with water samples and the 2,4-D herbicide, which was chosen for the tests because it was the most prevalent in environmental samples. The following concentrations were used: 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 5  $\text{mg L}^{-1}$ , 50  $\text{mg L}^{-1}$  and 100  $\text{mg L}^{-1}$ . The tests showed that only concentrations of 50 $\text{mg L}^{-1}$  and 100 $\text{mg L}^{-1}$  significantly inhibited the growth of the microalgae *Raphidocelis subcapitata*, with an  $IC_{50-196h}$  of 29,4  $\text{mg L}^{-1}$ . The land use in each watershed directly influenced the occurrence of pesticides in the streams studied, so that those located in catchments with larger areas of riparian forest and legal reserve had lower occurrences of pesticides. Finally, due to the excessive use of pesticides and the increasing detection of these compounds in aquatic environments, the importance of combining ecotoxicity tests and monitoring of the environmental occurrence of such compounds is highlighted in order to support a better understanding of the environmental risks associated with them.

**Keywords:** 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; Ecotoxicological tests; Pesticides; *Raphidocelis subcapitata*; Headwater streams.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Distribuição geográfica das sete microbacias de todos riachos estudados no município de São Carlos-SP .....  | 32 |
| Figura 2: Microbacias da área de estudo no município de São Carlos-SP .....  | 38 |
| Figura 3: Uso e ocupação na microbacia do riacho Campus 2, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal .....  | 39 |
| Figura 4: Uso e ocupação na microbacia do riacho Dagoberto, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal .....   | 40 |
| Figura 5: Uso e ocupação na microbacia do riacho Canchim, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal .....   | 41 |
| Figura 6: Uso e ocupação na microbacia do riacho Espraiado, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal .....   | 42 |
| Figura 7: Uso e ocupação na microbacia do riacho Mineirinho, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal .....  | 43 |
| Figura 8: Uso e ocupação na microbacia do riacho Sete Irmãos I, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal .....   | 44 |
| Figura 9: Uso e ocupação na microbacia do riacho Sete Irmãos II, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal .....  | 45 |
| Figura 10: Porcentagem do uso e ocupação do solo em cada microbacia dos riachos estudados, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal.....   | 46 |
| Figura 11: Síntese das concentrações (mg/L) de amônio analisadas nas coletas de fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020 nos riachos estudados. A concentração de referência atribuída por Cunha, Dodds e Calijuri (2011) representada pela linha em vermelho (0,1 mg/L). Os <i>boxplots</i> apresentam valores medianos, quartis 25% e 75%, além dos valores máximos e mínimos .....       | 48 |
| Figura 12: Síntese das concentrações (mg/L) de ortofosfato analisadas nas coletas de fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020 nos riachos estudados. A concentração de referência atribuída por Cunha, Dodds e Calijuri (2011) representada pela linha em vermelho (0,04 mg/L). Os <i>boxplots</i> apresentam valores medianos, quartis 25% e 75%, além dos valores máximos e mínimos ..... | 49 |
| Figura 13: Síntese das concentrações (mg/L) de nitrato analisadas nas coletas de fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020 nos riachos estudados. Os <i>boxplots</i> apresentam valores medianos, quartis 25% e 75%, além dos valores máximos e mínimos .....  | 50 |
| Figura 14: Porcentagem da ocorrência de compostos em sete riachos da cidade de São Carlos-SP em coletas realizadas em fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020.....   | 52 |
| Figura 15: Dados climatológicos da região de São Carlos durante o período de realização das coletas (janeiro de 2019 a fevereiro de 2020).....   | 54 |
| Figura 16: Número de moléculas encontradas em cada riacho considerando as coletas de fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020.....  | 55 |
| Figura 17: Densidade celular de <i>Raphidocelis subcapitata</i> (cel/mL) para todas as concentrações de 2,4-D testadas nos ensaios ecotoxicológicos. A intensidade de absorbância foi mensurada a cada 24 h durante 8 dias e correlacionada à densidade celular por meio de curva de calibração específica .....   | 57 |
| Figura 18: Ln das densidades celulares de todas as concentrações durante os 8 dias dos testes ecotoxicológicos; * indica diferença significativa (p < 0,05, ANOVA seguida  |    |

|   |    |
|---|----|
| por teste post-hoc de Tukey) na síntese dos resultados observados das concentrações em comparação com o controle.....   | 58 |
| Figura 19: Médias das concentrações de clorofila-a da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> em micrograma por litro ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) após 8 dias de exposição para todas as concentrações de 2,4-D testadas nos ensaios ecotoxicológicos; ..... | 59 |
| Figura 20: Curva predita sobre o efeito de inibição de crescimento da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> causada por diferentes concentrações do agrotóxico 2,4-D .....  | 60 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Riachos escolhidos para coleta, coordenadas geográficas e principais características das microbacias que os compreendem.....   | 31 |
| Tabela 2 - Limites de quantificação (LQ) do método de cromatografia líquida, para quantificação dos agrotóxicos (ng $L^{-1}$ ), realizada em parceria com o LQA-UNICAMP.....  | 35 |
| Tabela 3 - Área de mata ciliar das sete microbacias estudadas neste trabalho, e APP (Área de Preservação Permanente) mínima requerida de acordo com o código florestal brasileiro.....  | 47 |
| Tabela 4 - Concentração média (ng $L^{-1}$ ) dos compostos com mais de 50% de ocorrência analisados nos riachos nas coletas de fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020 .....  | 53 |
| Tabela 5 - Valores de $IC_{50}$ observados por outros autores que realizaram testes ecotoxicológicos com diversas microalgas, utilizando o agrotóxico 2,4-D isolado. * indica que efeitos de inibição de crescimento algal não foram observados para as concentrações testadas..... | 61 |

## SUMÁRIO

|  |  |           |
|--|--|-----------|
| <b>1</b>                               | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>2</b>                               | <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>20</b> |
| <b>3</b>                               | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>21</b> |
| 3.1                                    | Qualidade da água e alterações ambientais em bacias agrícolas: ênfase na atividade canavieira..... | 21        |
| 3.2                                    | Ocorrência de agrotóxicos em ambientes aquáticos em bacias ocupadas por cana-de-açúcar.....        | 23        |
| 3.3                                    | Ecotoxicidade de agrotóxicos.....  | 27        |
| <b>4</b>                               | <b>METODOLOGIA.....</b>  | <b>29</b> |
| 4.1                                    | Área de estudo.....  | 29        |
| 4.2                                    | Uso e ocupação do solo.....  | 33        |
| 4.3                                    | Caracterização geral dos riachos .....   | 34        |
| 4.4                                    | Ensaios ecotoxicológicos .....   | 36        |
| <b>5</b>                               | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>37</b> |
| 5.1                                    | Uso e ocupação do solo .....   | 37        |
| 5.2                                    | Análise de nutrientes.....   | 48        |
| 5.3                                    | Ocorrência de agrotóxicos .....  | 52        |
| 5.4                                    | Testes ecotoxicológicos .....  | 57        |
| <b>6</b>                               | <b>CONCLUSÕES .....</b>  | <b>62</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> |  | <b>64</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                    |  | <b>70</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de crescimento populacional gera mudanças significativas nas formas de uso e ocupação do solo em áreas rurais e urbanas, o que pode acarretar diversos impactos ambientais. De acordo com Von Sperling (1996), a poluição das águas é a adição de substâncias ou formas de energia que, direta ou indiretamente, alterem a natureza do corpo d'água de uma maneira que prejudique os legítimos usos que dele são feitos, como a conservação da biota aquática e a manutenção de serviços ecossistêmicos. Entre tais impactos, destacam-se descargas de efluentes industriais, domésticos e escoamento superficial, que são consideradas as fontes mais importantes de contaminação de águas superficiais e subterrâneas (USEPA, 1996).

Para atender às demandas por alimentos, energia e outros insumos à uma população cada vez maior, a expansão agrícola tem se processado de maneira rápida e muitas vezes não planejada, o que pode causar diversos danos aos recursos naturais (OLIVEIRA; AQUINO, 2020). A agricultura intensiva interfere de forma direta nos ecossistemas, devido a potenciais efeitos negativos associados à compactação de solo, perda de nutrientes, intensificação de processos erosivos, perda de fauna e flora e redução da qualidade de corpos d'água (FILOSO et al., 2015).

Com toda essa problemática, tem crescido o interesse pela análise da presença de determinados compostos nos corpos d'água, que são denominados “poluentes emergentes”, cuja ocorrência tem aumentado nos últimos anos. Em águas naturais, mesmo em concentrações relativamente baixas ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\text{pg L}^{-1}$ ), eles podem provocar efeitos nocivos sobre a biota e gerar desequilíbrios ecológicos (SODRÉ, 2010). Estes contaminantes englobam uma ampla diversidade de compostos, incluindo agrotóxicos, cianotoxinas, micotoxinas, aditivos de gasolina e industriais, retardantes de chama bromados, hormônios esteróides, substâncias tensoativas, produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, compostos polifluorados, nanomateriais e subprodutos de desinfecção (GAFFNEY, 2016).

A temática dos poluentes emergentes vem ganhando destaque desde a década passada e está sendo abordada em diferentes aspectos por pesquisadores

do mundo todo. Entretanto, a dificuldade de detecção desses contaminantes é um desafio que circunda esta área de estudo, visto que as concentrações observadas no meio ambiente podem ser muito baixas. Além disso, a presença de impurezas e interferentes encontrados nas amostras ambientais dificultam de forma significativa a análise qualitativa e quantitativa de contaminantes emergentes (ALBUQUERQUE et al., 2016). Portanto, uma instrumentação analítica sofisticada é necessária para a detecção desses contaminantes em amostras ambientais, carecendo de uma mão de obra especializada e apresentando alto custo operacional dessas análises (ARIAS et al., 2007). Portanto, surge um grande desafio para controle desses compostos, principalmente em escalas estaduais e nacionais.

Muitos destes compostos não são legislados, entretanto, podem ser reavaliados e futuramente regulamentados, dependendo dos resultados obtidos em estudos de ecotoxicidade relacionados aos efeitos ao meio ambiente e à saúde humana. Portanto, a compreensão dos possíveis riscos de novos compostos que não são contemplados nas atuais legislações vigentes, por meio de estudos ecotoxicológicos, pode mitigar uma série de impactos ambientais futuros (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Entre os poluentes emergentes, os agrotóxicos vêm sendo cada vez mais estudados, dada sua extensa utilização em todo o mundo. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), as vendas de agrotóxicos no Brasil cresceram 231% entre os anos de 2000 e 2018 (IBAMA, 2019). Um aspecto crítico que favorece a dispersão dos ingredientes ativos dos agrotóxicos em diferentes compartimentos ambientais é que, em termos gerais, apenas 45% da quantidade de produto aplicada se mantêm na área-alvo, os demais 55% se dissipam no ambiente para solos, águas superficiais e subterrâneas (GAVRILESCU, 2005).

A poluição ambiental decorrente do uso dos agrotóxicos constitui um problema em escala global (SOARES, 2017). Estes poluentes são potencialmente tóxicos a organismos alvo e não alvo, incluindo humanos, e, portanto, precisam ser manejados da forma correta no campo, respeitando-se as dosagens de aplicação e demais instruções de uso. Além disso, as embalagens utilizadas devem ter

destinação final adequada (WHO, 2015). Danos à saúde humana e às comunidades biológicas aquáticas podem ser ocasionados pelo contato direto ou indireto com esses produtos, dependendo da concentração e do tempo de exposição. Ressalta-se, ainda, a possível combinação de várias substâncias, que podem causar efeitos sinérgicos (MEYER-BARON et al., 2015).

A aplicação e o uso de agrotóxicos e fertilizantes durante os diferentes estágios de cultivo da cana-de-açúcar, aliados ao problema da supressão das matas ciliares, têm acarretado impactos sobre os recursos hídricos das áreas adjacentes a essas plantações (CORBI, 2006). Esses efeitos são intensificados de forma significativa quando há um manejo inadequado das culturas, com uma aplicação inadequada de agrotóxicos e nutrientes para manutenção das safras (ZORATTO, 2006). O estado de São Paulo é o maior produtor nacional de cana-de-açúcar, com um rendimento anual de 332,9 milhões de toneladas na safra 2018/19 (CONAB, 2019).

Uma maneira de avaliação dos impactos dos agrotóxicos é a utilização de estudos ecotoxicológicos, por meio dos quais são empregados organismos-teste na identificação de possíveis compostos que afetam os sistemas biológicos (LORO et al., 2015; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Entre os organismos utilizados para testes de toxicidade, as algas estão entre as mais recomendadas, visto que estas formam a base das cadeias alimentares e portanto são responsáveis por manter a funcionalidade de todo ecossistema (PFLEEGER et al., 1991). Existem diversas vantagens na utilização de algas em ensaios ecotoxicológicos, entre estes fatores está a elevada taxa de crescimento e a facilidade de cultivo em laboratório, tornando a realização de testes menos complexos, quando comparado com outros organismos. Outro fator muito importante para a utilização de algas em ensaios ecotoxicológicos, é a alta sensibilidade das algas à alguns contaminantes quando comparado com outros organismos, proporcionando uma melhor compreensão de possíveis impactos ambientais que não são identificados em análises mais simples (RIOBOO et al., 2007).

No município de São Carlos (SP), a atividade canavieira é um importante braço da economia, com uma área cultivada de 394,60 km<sup>2</sup> (INPE, 2018). Entretanto, ainda pouco se sabe sobre a ocorrência de agrotóxicos em cursos de

água da região e sua relação com o uso do solo. Sendo assim, esta pesquisa buscou preencher essas lacunas quanto às concentrações de alguns dos principais ingredientes ativos de agrotóxicos na água de riachos do município, correlacionando essas ocorrências aos diferentes usos do solo em suas respectivas áreas de drenagem, com foco nos plantios de cana-de-açúcar. Somado à realização de testes ecotóxicológicos com o agrotóxico com maior ocorrência nas amostras ambientais, buscando compreender os impactos causados na biota aquática. Espera-se que os dados gerados sirvam como informação de base para iniciativas de monitoramento ambiental de agrotóxicos e de recuperação da qualidade da água, além do planejamento e disciplinamento das formas de uso e ocupação do solo.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal dessa pesquisa foi avaliar a ocorrência de agrotóxicos comumente utilizados em culturas de cana-de-açúcar e outras variáveis de qualidade da água (amônio, ortofosfato e nitrato) em riachos de primeira ordem inseridos em microbacias com diferentes usos e ocupação do solo no município de São Carlos (SP). Para isso, foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a concentração de dezesseis agrotóxicos comumente utilizados na cultura de cana-de-açúcar em sete riachos do município;
- Relacionar a ocorrência dos agrotóxicos nos riachos com as diferentes formas de uso e ocupação do solo das suas respectivas microbacias e com as demais características da qualidade da água;
- Realizar testes ecotoxicológicos com o agrotóxico mais prevalente nos riachos utilizando a microalga *Raphidocelis subcapitata* como organismo teste.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Qualidade da água e alterações ambientais em bacias hidrográficas com ocupação agrícola: ênfase na atividade canavieira

Sistemas agrícolas são considerados um dos principais meios de potencial interferência nos ecossistemas, pela degradação da paisagem, desestruturação e perda de solo e nutrientes, bem como contribuição dos agrotóxicos utilizados em plantações, que podem atingir águas superficiais e subterrâneas. Diferentemente de fontes pontuais de poluição, o controle dessas fontes difusas é uma tarefa mais difícil, pois o escoamento superficial depende de uma série de fatores como intensidade da chuva, condições iniciais do solo, tipo de poluente, entre outros (ARMAS, 2006).

No estado de São Paulo, 80% da área cultivada possuem um ciclo da cana-de-açúcar de aproximadamente 12 meses, com o início entre setembro e novembro, no princípio da estação chuvosa (CANASAT, 2013). A Região Centro-Sul do país apresenta um calendário específico de colheita, tendo usualmente o período entre abril e dezembro como aquele de maior concentração dessa atividade (CONAB, 2019). Em relação à aplicação de agrotóxicos nas culturas de cana-de-açúcar, vários tipos podem ser usados tanto em períodos secos, como também em úmidos, sendo empregado quando há maior necessidade da prevenção e controle de pragas (BENEDINI; ARRIGONI, 2008).

No Brasil, de 1996 até 2016 as áreas destinadas ao cultivo da cana-de-açúcar foram expandidas em aproximadamente 108%, chegando a mais de 10 milhões de hectares na safra 2019/2020 (CONAB, 2019). Com tal expansão, preocupações acerca de impactos ambientais associados ao cultivo da cana e à produção do açúcar e do etanol em larga escala levaram à criação de indicadores como formas de avaliar alterações sobre a biodiversidade, solo, atmosfera e água. A qualidade do solo é comprometida pela erosão e compactação, além da acidificação e perda de nutrientes. Os impactos relacionados à água estão geralmente ligados ao uso desse recurso tanto na fase agrícola quanto industrial e uso de fertilizantes e agrotóxicos durante o cultivo, que podem ser lixiviados aos

cursos d'água. Por fim a poluição atmosférica se deve à atividade industrial e queima da palha da cana-de-açúcar (FILOSO et al., 2015).

A produção agrícola em países situados nos trópicos geralmente se encontra sobre maior pressão de pragas e ervas daninhas, devido as favoráveis condições ambientais para a proliferação dos mesmos (LEWIS et al., 2016). Assim, a intensificação do uso de agrotóxicos tem se tornado um tópico cada vez mais relevante na América Latina nas últimas décadas, e em contrapartida, pouco se sabe em relação ao destino, toxicidade e efeitos de mistura desses compostos nos riachos tropicais (CARRIQUIRBORDE et al., 2014). Frequentemente a poluição das águas é ocasionada por atividades agrícolas, aproximadamente 10% dos agrotóxicos aplicados na agricultura são carreados ao ambiente aquático por escoamento superficial de águas pluviais e vento, dependendo de fatores ambientais (ISLAM et al., 2018)

O uso e ocupação do solo têm importante influência sobre a qualidade ambiental, uma vez que as atividades antropogênicas podem alterar processos físico-químicos e biológicos de sistemas naturais (MENEZES et al., 2016). Assim, caracterizar o uso e ocupação da área de estudo é um passo fundamental para compreender impactos e origens de alteração na qualidade de água. Desta forma, técnicas de geoprocessamento se mostram uma ferramenta valiosa para avaliação das possíveis causas da ocorrência de contaminantes em águas superficiais e subterrâneas (ZEILHOFER et al., 2007). Além disso, Zeilhofer et al. (2007) também ressaltaram que técnicas de geoprocessamento são uma ferramenta importante para avaliação de interferência de uso e ocupação do solo das bacias hidrográficas na presença de agrotóxicos em águas superficiais.

A qualidade da água de um corpo hídrico está intrinsecamente relacionada aos usos do solo na sua respectiva bacia hidrográfica (TEODORO, 2007). Os estudos para mapeamento das formas de uso e ocupação do solo têm sido impulsionados pela consolidação dos Sistemas de Informações Geográficas (SIG). O surgimento de formas digitais consistentes de representação do relevo, como os Modelos Digitais de Elevação (MDEs), aliadas a métodos automáticos para delimitação de bacias hidrográficas, têm auxiliado em estudos ambientais que

buscam estabelecer correlações entre as categorias de uso do solo e a qualidade da água (GARBRECHT e MARTZ, 2000).

Tem sido observado que a atividade canavieira intensifica de forma significativa a degradação do solo e carreamento de carbono orgânico particulado e nutrientes aos cursos d'água (GOMES et al., 2019). Portanto, impacta de forma direta a qualidade da águas de riachos, alterando os parâmetros físicos, químicos e biológicos da água de cursos d'água adjacentes às plantações (NHIWATIWA; DALU; BRENDOONC, 2017)

Isto foi observado por Mitchell, Brodie e White (2005), onde realizaram um estudo na Austrália buscando compreender a dinâmica de transferência de poluentes aos rios logo após eventos de chuva. Os autores analisaram diversos rios tropicais em localidades distintas e, portanto, com diversos usos e ocupação em suas respectivas bacias hidrográficas.

Foi observado que áreas com significativa presença de culturas de cana de açúcar influenciaram diretamente na concentração de agrotóxicos, fósforo e nitrogênio durante, e logo após os eventos de chuva. Isto ocorreu devido à transferência desses compostos pelo escoamento superficial das águas sobre a superfície do solo. Os agrotóxicos quantificados no trabalho foram: diuron, Atrazina, hexazinona, ametrina e 2,4-D e chegaram às concentrações de 8,5 µg/L.

### 3.2 Ocorrência de agrotóxicos em ambientes aquáticos em bacias ocupadas por cana-de-açúcar

O termo “agrotóxico” em vez de “defensivo agrícola” passou a ser utilizado, no Brasil, para denominar os venenos agrícolas. Essa mudança retrata mais que uma alteração na terminologia, mas também deixa em maior evidência o potencial perigo desses produtos para o ecossistema e a saúde humana (OPAS, 1996). Ainda assim, devido ao crescimento do setor agrícola houve um intenso aumento na utilização de agrotóxicos e, portanto, com o passar dos anos surgiu uma variedade de moléculas com propriedades distintas, que apresentam comportamentos ambientais distintos tanto em sua toxicidade quanto sua mobilidade (ARMAS, 2006). De acordo com o autor, essas moléculas possuem distintas propriedades, que lhes conferem diversos graus de persistência

ambiental, efeitos negativos à organismos não alvo e possíveis impactos à saúde humana.

Atualmente, a presença de agrotóxicos na água é uma ameaça aos ambientes aquáticos e à saúde humana, este é um problema que tem se agravado cada vez mais principalmente devido à expansão de fronteiras agrícolas e o consequente aumento do consumo desses produtos. O Brasil é maior consumidor agrotóxicos no mundo, e conta com a quantidade utilizada de aproximadamente 20% em relação ao consumo total mundial (ALBUQUERQUE, 2016).

O uso de agrotóxicos na agricultura pode ser responsável pela contaminação das águas superficiais adjacentes, em que concentrações de compostos em determinadas localidades podem contribuir em um impacto acumulado em locais distantes de áreas em que foram originalmente empregados. Devido a isso diversos estudos já apontam que a presença de agrotóxicos em corpos hídricos tem aumentado o número de ocorrências, principalmente em regiões próximas às áreas agrícolas (VEIGA et al., 2006).

A dissipação de agrotóxicos no ambiente é influenciada por uma série de fatores, incluindo sua composição química, forma de manuseio, características do solo, topografia, pluviosidade, ventos e temperatura (BEUKE et al., 2006; GAVRILESCU, 2005). Segundo Spadotto (2006), condições meteorológicas estão estreitamente correlacionadas com a segurança ambiental do uso de agrotóxicos, visto que durante e após a aplicação há um risco muito maior de carreamento desses poluentes a locais não-alvo quando há evento de precipitação. Assim, entre outros fatores, a elevada precipitação pluviométrica nos trópicos pode intensificar os processos de escoamento superficial e lixiviação do solo, o que potencializa o fluxo desses compostos para corpos d'água (SANCHEZ-BAYO; HYNE, 2011).

A duração e a periodicidade da exposição dos seres vivos aos agrotóxicos afetam diretamente a toxicidade. Na exposição aguda, o organismo entra em contato com o composto químico durante um período de tempo relativamente curto, geralmente horas ou dias. Nesses casos, a absorção do agente é instantânea e os efeitos ocorrem em um espaço de tempo muito curto, apesar de ser possível a produção de efeitos a longo prazo similares à exposição crônica (RAND; PETROCELLI, 1985). Na exposição crônica, organismos são expostos a baixas

concentrações de compostos, porém em elevada frequência e durante um prolongado intervalo de tempo, sendo geralmente meses ou anos. Nestes casos, a absorção ocorre de forma lenta e contínua, provocando efeitos que se desenvolvem paulatinamente (RAND; PETROCELLI, 1985). A exposição contínua aos agrotóxicos ainda não é completamente entendida, porém pode causar: alterações reprodutivas, distúrbios endócrinos, efeitos mutagênicos, citotóxicos, carcinogênicos e no sistema nervoso central (MEYER-BARON et al., 2015).

Já no final da década de 70, Leonard et al. (1979) compararam dados de diversas microbacias em Athens-GA, nos Estados Unidos, e concluíram que as concentrações de alguns agrotóxicos (atrazina, cianazina, difenamida, paraquat, propazina e triflularina) em riachos possuem relação direta com a superfície do solo da bacia onde houve a aplicação de cada produto. Em que as concentrações desses agrotóxicos foram significamente maiores em microbacias com maior porcentagem de área agrícola.

Soares (2011) realizou um estudo em mananciais superficiais de abastecimento público na região de Manhuaçu (MG), e com o auxílio de ferramentas de geoprocessamento buscou compreender o comportamento do carreamento de alguns agrotóxicos (mancozeb, epoxiconazole, endosulfan) de acordo com as características de ocupação dos diversos pontos estudados. O autor concluiu que ocupações irregulares constatadas nas áreas de preservação permanente, especialmente nas áreas íngremes e naquelas que deveriam ser destinadas às matas ciliares, contribuíram significativamente para a contaminação das águas dos mananciais superficiais da região de estudo.

Bortoluzzi et al. (2006) estudaram a qualidade da água de córregos margeados por áreas agrícolas em Agudo-RS, os autores analisaram alguns agrotóxicos (imidacliprido, atrazina, simazina e clomazone) durante três épocas do cultivo do fumo: transplante, aterramento e colheita. Embora os locais de estudos apresentassem áreas de cultivo semelhantes, os autores reportaram que microbacias com a presença de mata ciliar predominante tenderam a não transferir moléculas de agrotóxicos para águas superficiais, enquanto microbacias com ausência de vegetação permanente em torno dos riachos foram comprometidas devido à presença de princípios ativos de diversos herbicidas.

Metcalfe et al. (2019) realizaram um estudo nos Grandes Lagos da América do Norte e concluíram que as diferenças das culturas de campo nas bacias hidrográficas estavam diretamente relacionadas com a detecção de agrotóxicos em águas superficiais. Os autores determinaram as concentrações de alguns agrotóxicos (atrazina, 2,4-D, dicamba, imidacloriprido, tiameksam e clotianidina), que se mostraram prevalentes em bacias hidrográficas com maior parte de uso agrícola ou área urbana.

Um estudo foi realizado por Acyaba et al. (2021) com o propósito de quantificar 13 agrotóxicos amplamente usados em culturas de cana de açúcar nas águas superficiais de diversos municípios do estado de São Paulo. Durante um período de 12 meses foram coletadas ao todo 196 amostras de 28 diferentes localidades, com uma quantificação por cromatografia líquida de alta performance associada a um espectrômetro de massas (HPLC-MC). Todos os agrotóxicos foram detectados em pelo menos uma amostra, entretanto, os agrotóxicos diuron, hexazinona, tebutiuron, 2,4-D, e carbendazim foram os mais prevalentes nas amostras ambientais, com uma prevalência maior que 90%. No estudo realizado pelos autores não foi observada diferença entre a ocorrência dos agrotóxicos e as diferentes épocas do ano. Entretanto, diversos agrotóxicos foram muito prevalentes nas amostras, durante todo o período de estudo. Isto se deve, muito provavelmente ao intensivo uso de agrotóxicos nas plantações, visto que a região possui grande parte do território ocupada por culturas de cana.

O cultivo de cana no Brasil está entre as culturas que mais utiliza agrotóxicos, com uma média de consumo de aproximadamente 12% em relação ao volume total aplicado (ABRASCO, 2012). Além disso, aproximadamente 15% da comercialização de agrotóxicos foi realizada no estado de São Paulo, totalizando mais de 90 mil toneladas no ano de 2019 (IBAMA, 2019). O glifosato, 2,4-D, Atrazina, malation e tebutiuron estão entre os agrotóxicos mais vendidos no estado, com um consumo anual de aproximadamente 30 mil toneladas ao ano (IBAMA, 2019).

Devido a sua eficiência, baixo custo e espectro abrangente no controle de ervas daninhas, o 2,4-D se tornou um agrotóxico amplamente utilizado em diversas áreas agrícolas no mundo, se tornando amplamente encontrado em amostras

ambientais em diversas localidades (DEHNERT et al., 2018). A concentração do herbicida 2,4-D durante ou logo após sua aplicação rem se mostrado muito maior que o esperado em amostras ambientais, além disso os organismos bioacumulam este agrotóxico em um período muito curto de tempo (KILJANEK et al., 2016). Portanto, a concentração de 2,4-D encontrada em algumas amostras ambientais pode afetar a biota aquática, particularmente no caso de aplicações deste agrotóxico em regiões próximas à cursos d'água (BROWNE; MOORE, 2014)

### 3.3 Ecotoxicidade de agrotóxicos

Mesmo com a existência de diversos dados ecotoxicológicos a respeito dos agrotóxicos, ainda é encontrada pouca informação sobre o efeito dessas substâncias à saúde humana e seus possíveis impactos ao meio ambiente (SIMPLÍCIO, 2015). Portanto, isso dificulta uma análise mais aprofundada desses compostos, visto que seus efeitos são difíceis de ser compreendidos e sua quantificação em amostras ambientais exigem uma tecnologia cara e complexa (MONTAGNER; UMBUZEIRO, 2016).

Contaminações ambientais podem não ser detectadas por análises físico-químicas usuais, pois poluentes eventualmente estão inseridos de forma que a percepção do impacto seja mais complexa. Para isso a Ecotoxicologia surgiu como uma ciência que é capaz de responder preditivamente à toxicidade de compostos químicos, bem como na detecção da ecotoxicidade de ambientes já impactados (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). De acordo com Markert, Breue e Zechmeister (2003), a Ecotoxicologia assume o papel de identificar e avaliar interferências causadas por substâncias inseridas no ambiente pela atividade humana à organismos, de maneira similar também se pode utilizar esse conceito para uma ciência que prediz efeitos de agentes tóxicos sobre ecossistemas e organismos não alvos (HOFFMAN et al., 2003).

Com o avanço da aplicação dos testes ecotoxicológicos em ensaios laboratoriais sob condições específicas e controladas, é possível expor organismos a diferentes situações e avaliar efeitos tóxicos a partir da forma em que os mesmos reagem às diferentes condições experimentais (NEWMAN, 2014). Assim, a Ecotoxicologia tem um papel importante no controle da poluição hídrica, pois pode

subsidiar a definição de limites para presença de contaminantes no ambiente e auxiliar no estabelecimento nos padrões de qualidade de águas e efluentes (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Como os resultados preliminares da presente pesquisa indicaram alta prevalência do agrotóxico 2,4-D nas amostras ambientais, este foi escolhido para os testes ecotoxicológicos.

Wong e Chang (1988) realizaram testes expondo a alga *Chlamydomonas reinhardtii* a diferentes concentrações de alguns agrotóxicos isolados, entre eles o 2,4-D. Os autores realizaram testes de 8 dias sob a condição de fotoperíodo 16/8 h, 6000 lux e 25°C. Ao final do teste, determinaram a concentração de clorofila-a e concluíram que a partir de 20 mg L<sup>-1</sup> houve completa inibição no crescimento da alga.

Outro teste utilizando o 2,4-D foi realizado por Martínez-Ruiz e Martínez-Jerônimo (2018), no qual expuseram a alga *Ankistrodesmus falcatus* sob as condições de fotoperíodo 24/0 h, 4.000 lux e 25°C. A partir da análise da densidade celular algal, os autores observaram que a partir de 100 mg L<sup>-1</sup> já houve efeitos de inibição no crescimento da alga, porém uma completa inibição só foi observada na concentração de 1353,8 mg L<sup>-1</sup>. Wong (2000) realizou testes similares aos autores anteriores, com a alga *Scenedesmus quadricauda* sob condições de fotoperíodo 16/8 h, 5.500 lux e 25°C. Durante o período de teste o autor retirava alíquotas das amostras e a partir da densidade celular estimou uma taxa de crescimento para cada concentração de 2,4-D. Assim, percebeu que embora um início de inibição do crescimento da alga tenha sido observado sob 2 mg L<sup>-1</sup> do herbicida, uma completa inibição ocorreu sob concentrações de 20 mg L<sup>-1</sup> ou mais.

Nema, Hanson e Müller (2018) realizaram testes ecotoxicológicos usando o 2,4-D isolado, com a alga *Oophila amblystomatis* sob as condições de fotoperíodo 24/0 h, 14.800 lux e 18°C durante um período de 96 horas. Os autores observaram uma inibição de 50% do crescimento algal na concentração de 79 mg L<sup>-1</sup>.

Zhu et al. (2016) também utilizaram o 2,4-D isolado para realização de testes ecotoxicológicos, com a alga *Scenedesmus obliquus*, sob as condições de fotoperíodo 14/10 h, 3700 lux e 25°C em frascos sem agitação durante 9 dias. Os autores testaram quatro concentrações, sendo elas 2 µg L<sup>-1</sup>, 20 µg L<sup>-1</sup>, 200 µg L<sup>-1</sup> e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, e não

observaram diferença estatística significativa no crescimento algal de nenhuma amostra em comparação ao controle.

Moreira et al (2020) realizaram ensaios ecotoxicológicos expondo a microalga *Raphidocelis subcapitata* aos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, sob as condições de fotoperíodo 24/0 h, 3.800-4.000 lux, 24ºC e agitação manual 3 vezes ao dia, durante 96 horas. Os autores analisaram a taxa de crescimento, fluorescência da clorofila-a e morfologia celular da *Raphidocelis subcapitata* para as concentrações de 30, 70, 150, 350 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  do 2,4-D isolado, e não observaram diferença significativa de taxa de crescimento em relação ao controle ( $p<0,05$ ). Entretanto as duas maiores concentrações testadas (350 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) causaram um aumento significativo ( $p<0,05$ ) no aumento de fluorescência da clorofila-a, e todas as concentrações de 2,4-D testadas aumentaram o tamanho celular da *Raphidocelis subcapitata*. Além disso, os efeitos da mistura do 2,4-D e fipronil causaram efeitos deletérios à microalga *Raphidocelis Subcapitata*, mesmo nas menores concentrações testadas pelos autores, indiciando efeitos interativos entre os agrotóxicos.

Portanto, foram observados efeitos significativos no crescimento das algas em concentrações de 2,4-D na ordem de  $\text{mg L}^{-1}$ . Assim, os testes da presente pesquisa foram realizados buscando abranger essa gama já estudada em trabalhos anteriores e levando-se em conta, ainda, os resultados das amostras coletadas em campo.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Área de estudo

O município de São Carlos está localizado no interior do estado de São Paulo, a uma altitude média de 860m em relação ao nível do mar. Com uma população de 233.249 habitantes, possui área total de 1.136,91  $\text{km}^2$  e taxa de urbanização de aproximadamente 96% (SEADE, 2021).

De acordo com a classificação climática de Köppen (1948), o município de São Carlos possui clima do tipo Cwa (subtropical), caracterizado por verão chuvoso e inverno seco bem definidos. O bioma predominante é o Cerrado, com presença de mata galeria em regiões com solos mais úmidos (SETZER, 1996). A região se

encontra nos limites da Bacia Hidrográfica do Jacaré-Guaçu, localizada na UGRHI (Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos) 13 (Tietê-Jacaré).

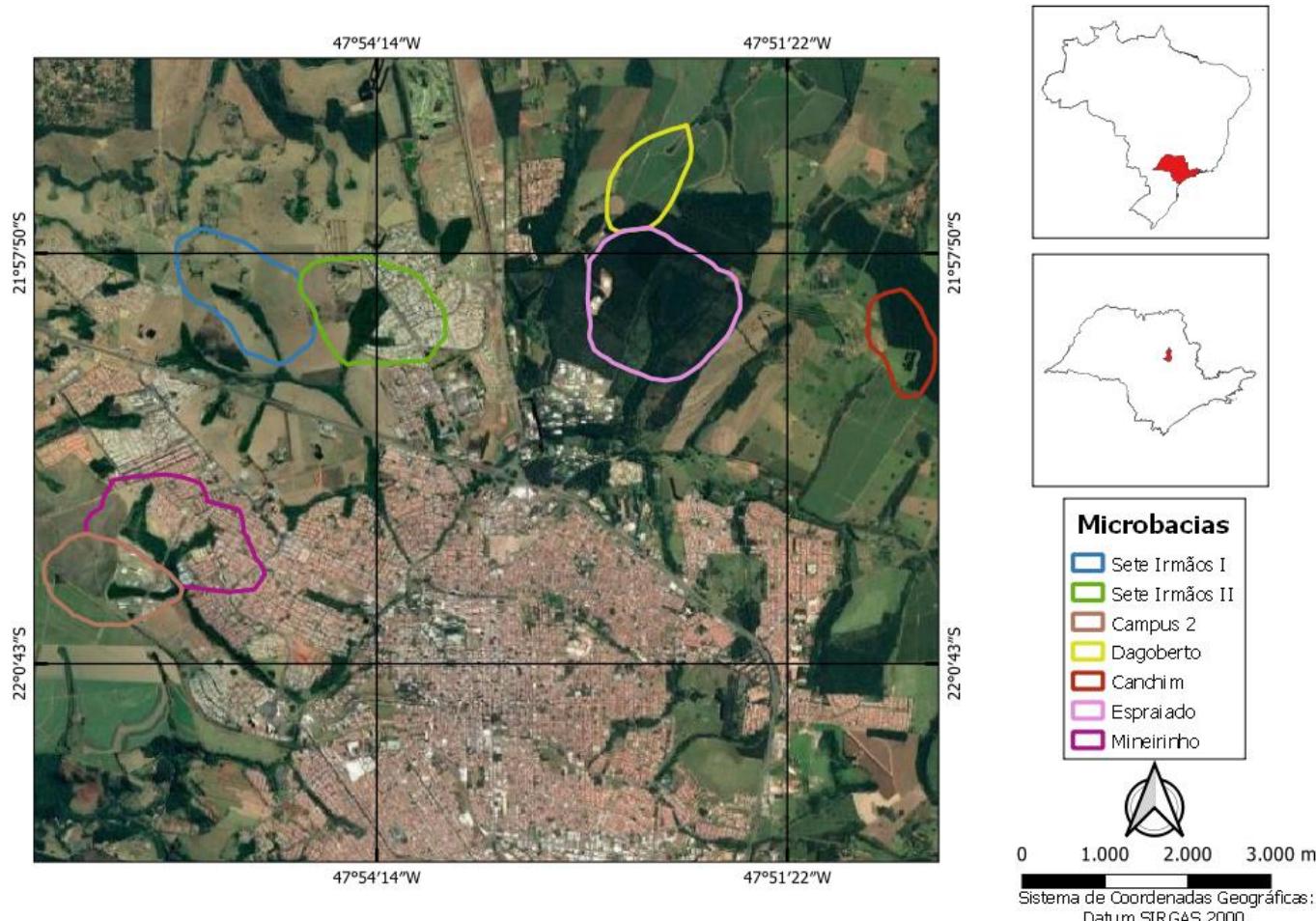
Foram estudados trechos de sete riachos que drenam o município (Tabela 1 e Figura 1). Para a seleção dos riachos, consideraram-se diferentes usos e ocupação do solo nas respectivas microbacias, além do acesso aos pontos de coleta e de questões logísticas.

**Tabela 1** - Riachos escolhidos para coleta, coordenadas geográficas e principais características das microbacias que os compreendem

| Riacho               | Coordenadas Geográficas          | Domínio  | Características gerais da microbacia   |
|----------------------|----------------------------------|--|--|
| <b>CANCHIM</b>       | 21°58'5.62" S<br>47°50'33.17" O  | Embrapa Pecuária Sudeste                                   | Área de preservação permanente e reserva legal; mata ciliar em torno de 300m em ambas as margens.  |
| <b>CAMPUS 2</b>      | 22°0'12.09" S<br>47°55'36.37" O  | Propriedade pública: campus universitário                  | Área de cultivo de cana-de-açúcar a montante; área de plantio de pinus; mata ciliar em torno de 20 a 30 m em ambas as margens.                             |
| <b>DAGOBERTO</b>     | 21°56'56.94" S<br>47°52'3.35" O  | Fazenda privada de produção de cana-de-açúcar              | Área de cultivo de cana-de-açúcar adjacente ao riacho; vegetação com sinais de degradação, mata ciliar praticamente ausente.                               |
| <b>ESPRAIADO</b>     | 21°58'42.03" S<br>47°52'20.90" O | Parque Ecológico de São Carlos Dr. Antônio Teixeira Vianna | Área preservada com visitação turística; É usado para captação de água para abastecimento de São Carlos; mata ciliar em torno de 100m em ambas as margens. |
| <b>MINEIRINHO</b>    | 22° 0'9.34"S<br>47°55'38.16"O    | Propriedade pública: campus universitário                  | Área de cultivo de cana-de-açúcar a montante; área de plantio de pinus; mata ciliar em torno de 20 a 30 m em ambas as margens.                             |
| <b>SETEIRMÃOS I</b>  | 21°58'36.98" S<br>47°54'27.20" O | Fazenda privada de produção de cana de açúcar              | Área de cultivo de cana-de-açúcar adjacente ao riacho; vegetação com sinais de degradação, mata ciliar em torno de 5 a 10 m em ambas as margens.           |
| <b>SETEIRMÃOS II</b> | 21°58'36.76" S<br>47°54'27.20" O | Fazenda privada de produção de cana de açúcar              | Área de cultivo de cana-de-açúcar adjacente ao riacho; vegetação com sinais de degradação, mata ciliar em torno de 5 a 10 m em ambas as margens.           |

**Fonte:** Autoria própria

**Figura 1:** Distribuição geográfica das sete microbacias de todos riachos estudados no município de São Carlos-SP



**Fonte:** Autoria própria

Conforme exposto na Figura 1, é possível observar que existe uma grande distância entre as 7 bacias de estudo, e uma significativa diferença entre seus respectivos uso e ocupação do solo. As áreas das microbacias variaram entre 0,78 km<sup>2</sup> (Canchim) e 2,72 km<sup>2</sup> (Espraiado). Foram realizadas ao todo três coletas, em fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020, as amostras ambientais sempre foram coletadas no mesmo local, durante todo projeto.

#### 4.2 Uso e ocupação do solo

O ponto de partida para a avaliação do uso e ocupação do solo foi a delimitação das microbacias. Esta delimitação se deu pela extração dos dados da ferramenta do Google Earth Pro (versão 7.3) e posterior manipulação dos arquivos e confecção de mapas no programa Qgis (versão 3.6.0.). Foi retirada do Google a base dos dados altimétricos empregados para elaboração dos Modelos Digitais de Elevação (MDEs) e para obtenção das imagens de satélite. A delimitação das microbacias foi de maneira manual, empregando os MDEs e extraindo-se as curvas de nível.

Após delimitadas, as microbacias foram fragmentadas em polígonos correspondentes a cada tipo de uso destinado a área, sendo classificadas em quatro categorias principais: uso agropecuário, área urbana, mata ciliar e reserva legal. Essa determinação foi feita pelo método manual, por interpretação visual das imagens de satélite, com posterior vetorização e cálculo das áreas absolutas e relativas de cada categoria (COELHO e GUERRA, 2011).

Em zonas rurais, consideram-se Áreas de Preservação Permanente as faixas marginais de qualquer curso d'água natural desde a borda da calha do leito regular, em largura mínima de 30 m, assim como nas áreas no entorno das nascentes um raio mínimo de 50 m consoante o Art. 4º da Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). Deste modo, foram confeccionados mapas para analisar se a área de mata ciliar observada atende à legislação atualmente vigente.

#### 4.3 Caracterização geral dos riachos

Foram estimadas *in situ* as variáveis físico-químicas de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica) utilizando-se uma sonda multiparâmetros (Modelo HI 9829, HANNA Instruments).

Os dados climatológicos (temperatura do ar e precipitação) foram obtidos por meio da estação climatológica de São Carlos – A711 (Código OMM 86845) do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia).

A determinação das concentrações dos agrotóxicos foi realizada em parceria com o Laboratório de Química Ambiental – Instituto de Química – LQA-UNICAMP, sendo empregado o método de cromatografia líquida de alta performance associada a um espectrômetro de massas (HPLC-MC). As moléculas quantificadas foram 16 agrotóxicos (2-hidroxiatrazina, 2,4-D, ametrina, atrazina, azoxistrobina, carbendazim, carbofuran, clomazona, diuron, fipronil, hexazinona, imidaclíprido, malation, simazina, tebutiuron e tebuconazole), com os respectivos limites de quantificação apresentados na Tabela 2. As amostras de cada riacho foram coletadas superficialmente em frascos de vidro âmbar de 500 mL, refrigeradas em caixa térmica e geladeira a 4°C e, posteriormente, encaminhadas ao LQA-UNICAMP.

**Tabela 2** - Limites de quantificação (LQ) do método de cromatografia líquida, para quantificação dos agrotóxicos ( $\text{ng L}^{-1}$ ), realizada em parceria com o LQA-UNICAMP.

| Compostos         | LQ<br>( $\text{ng L}^{-1}$ ) |
|-------------------|------------------------------|
| Carbendazim       | 1                            |
| 2-hidroxiatrazina | 5                            |
| Imidacloprido     | 5                            |
| Simazina          | 10                           |
| Ametrina          | 1                            |
| Carbofurano       | 1                            |
| Hexazinona        | 50                           |
| Tebutiuron        | 1                            |
| Atrazina          | 5                            |
| Diuron            | 1                            |
| Clomazona         | 1                            |
| Azoxistrobina     | 1                            |
| Malation          | 1                            |
| Tebuconazole      | 1                            |
| 2,4-D             | 1                            |
| Fipronil          | 0,1                          |

As concentrações dos nutrientes dissolvidos (nitrato, amônio e ortofosfato) foram determinadas no Laboratório de Biotoxicologia em Águas Continentais e Efluentes – BIOTACE da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - EESC/USP. As amostras foram coletadas e acondicionadas em frascos de polietileno, sendo posteriormente filtradas a vácuo com membranas GF/C de 0,45  $\mu\text{m}$  e congeladas a -18°C até a realização das análises. Para o amônio, empregou-se o método de colorimetria (SOLÓRZANO, 1969); para o nitrato e para o ortofosfato, espectrofotometria, respectivamente os métodos 4.500 –  $\text{NO}_3\text{B}$  (MACKERETH et al., 1978) e 4500 – P.E (APHA, 2012).

#### 4.4 Ensaios ecotoxicológicos

A análise de ecotoxicidade foi baseada na norma ABNT NBR 12648:2018 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae), com a espécie *Raphidocelis subcapitata*. Os testes foram realizados no Laboratório BIOTACE - EESC/USP. A espécie *Raphidocelis subcapitata* é uma alga verde unicelular pertencente ao grupo das clorofíceas. Esta microalga ocorre em ambientes oligotróficos a eutróficos (BLAISE e VASSEUR, 2005), e é amplamente utilizada em estudos ecotoxicológicos, devido a sua rápida resposta a contaminantes ambientais (REYNOLDS; GILTRAP; CHAMBERS, 2021).

A microalga *Raphidocelis subcapitata* foi cultivada em meio L.C. OLIGO, previamente autoclavado a 121°C por 15 min, a temperatura de 25°C ± 2°C, com fotoperíodo 24/0 h e luminosidade de 4.500 lux. Os testes crônicos ocorreram em triplicata, durante um período de exposição de oito dias sem agitação. A montagem do teste ocorreu em capela de fluxo laminar, previamente limpa com álcool 70%. Testes de ecotoxicidade com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl, ≥ 99%) foram realizados por Diniz (2020) para avaliar as condições fisiológicas dos organismos e para validar os ensaios (MANSANO, 2016).

Os testes ocorreram com o agrotóxico 2,4-D, que se mostrou o mais prevalente nas amostras dos riachos estudados. Foi analisado um amplo espectro de concentrações como contribuição inicial aos estudos ecotoxicológicos com o 2,4-D: 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 5  $\text{mg L}^{-1}$ , 50  $\text{mg L}^{-1}$  e 100  $\text{mg L}^{-1}$ .

A densidade algal foi estimada diariamente por leitura de absorbância em espectrofotômetro a 680 nm e obtidas a partir de uma curva analítica pré-determinada (DINIZ et al., 2020). No primeiro e último dia, as amostras foram filtradas em membrana GF-3 (0,45  $\mu\text{m}$ ) para determinação de clorofila-a, de acordo com NUSCH (1980).

Os dados da densidade algal foram linearizados (OECD, 2011), e todos os dados tiveram sua normalidade previamente confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. A Análise de Variância (one way ANOVA) foi aplicada para avaliar as diferenças entre os tratamentos realizados e o controle, considerando-se um nível de

confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Quando esta análise indicou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na densidade celular e na síntese de clorofila-a entre os diferentes tratamentos realizados, acrescentou-se o teste post-hoc de Tukey. Os testes foram realizados por meio do software Statistica®.

A concentração que induz metade da resposta máxima ( $IC_{50-196h}$ ) dos testes de ecotoxicidade foi calculada para o parâmetro densidade celular, por meio de uma equação linearizada de dose-resposta. A construção do gráfico foi realizada por meio do software Origin®.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

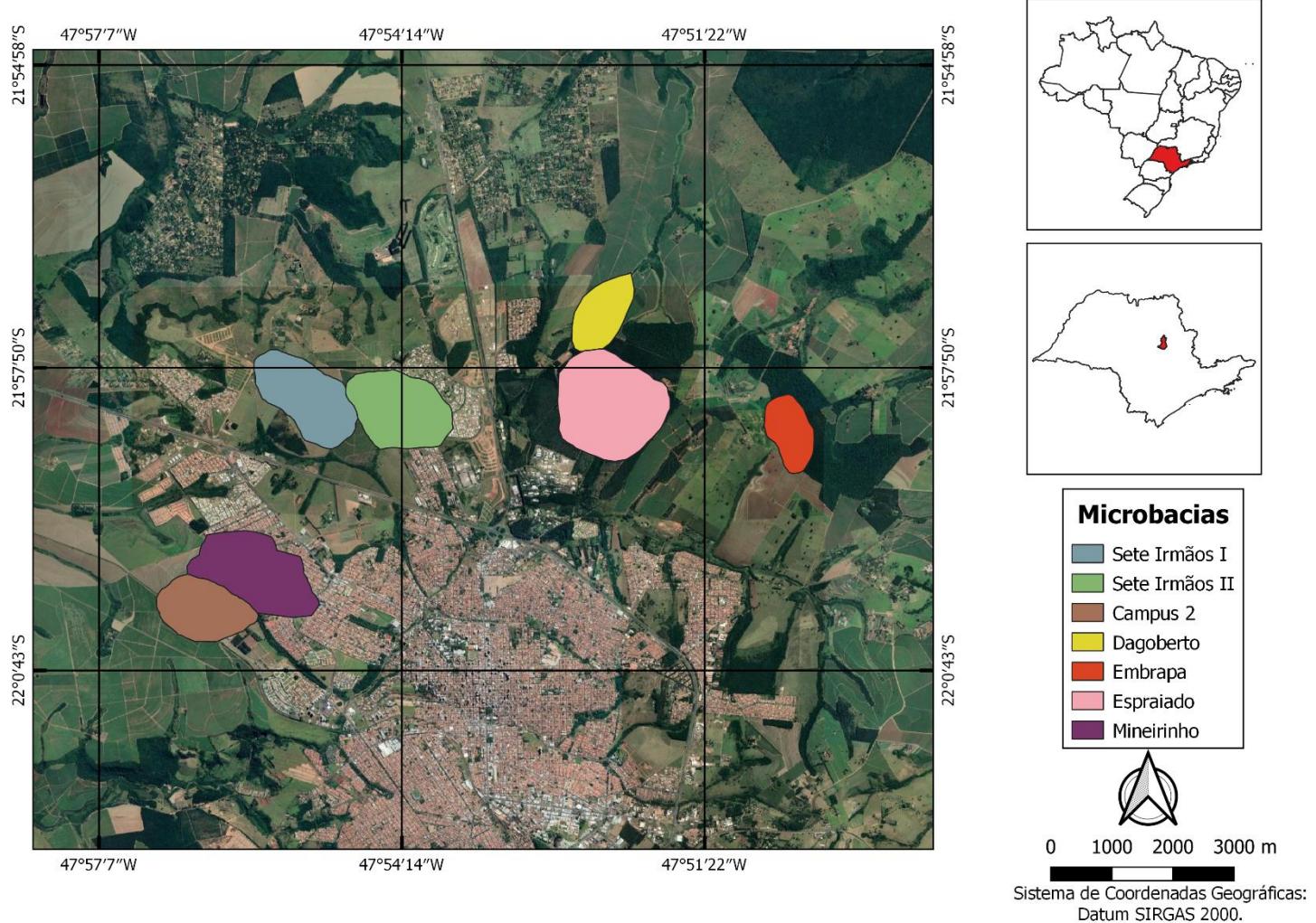
### 5.1 Uso e ocupação do solo

As microbacias estudadas (Figura 2) foram caracterizadas de acordo com o uso e ocupação do solo (Figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Nas figuras, é possível observar que há uma ampla variação na contribuição relativa das diferentes categorias de uso de ocupação nas microbacias.

Houve destaque na ocupação agrícola nas microbacias do Sete Irmãos I, Dagoberto e Campus 2, com mais de 50% de sua área ocupada por culturas de cana. Já as bacias Sete Irmãos II e Mineirinho apresentaram maior influência urbana, enquanto as microbacias Canchim e Espraiado foram majoritariamente ocupadas por vegetação nativa em áreas de mata ciliar e reserva legal.

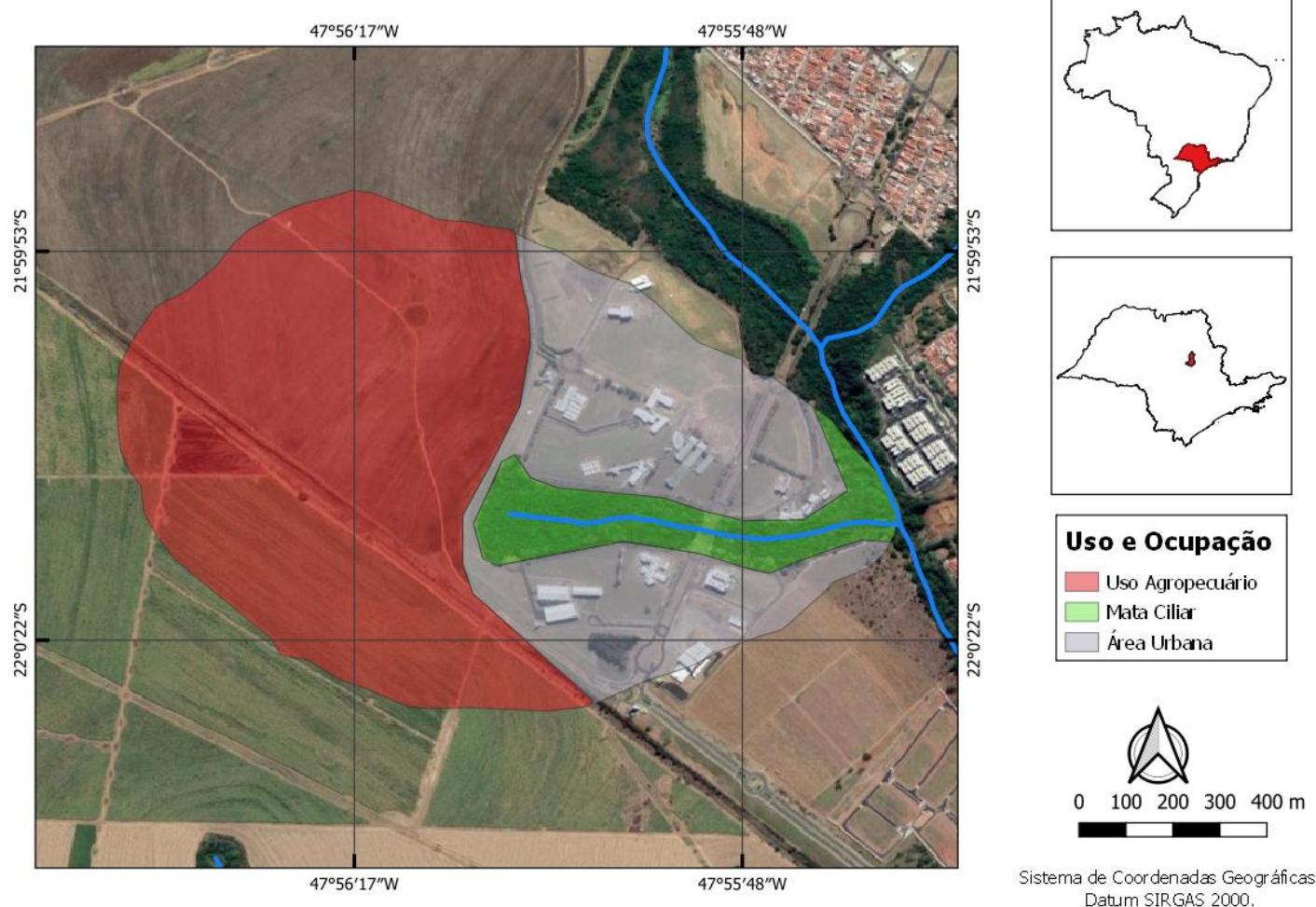
Como também pode se observar nas Figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, os riachos Campus 2, Dagoberto, Canchim e Sete Irmãos I são riachos de primeira ordem, enquanto os riachos Espraiado, Mineirinho e Sete Irmãos II são de segunda ordem.

**Figura 2:** Microbacias da área de estudo no município de São Carlos-SP



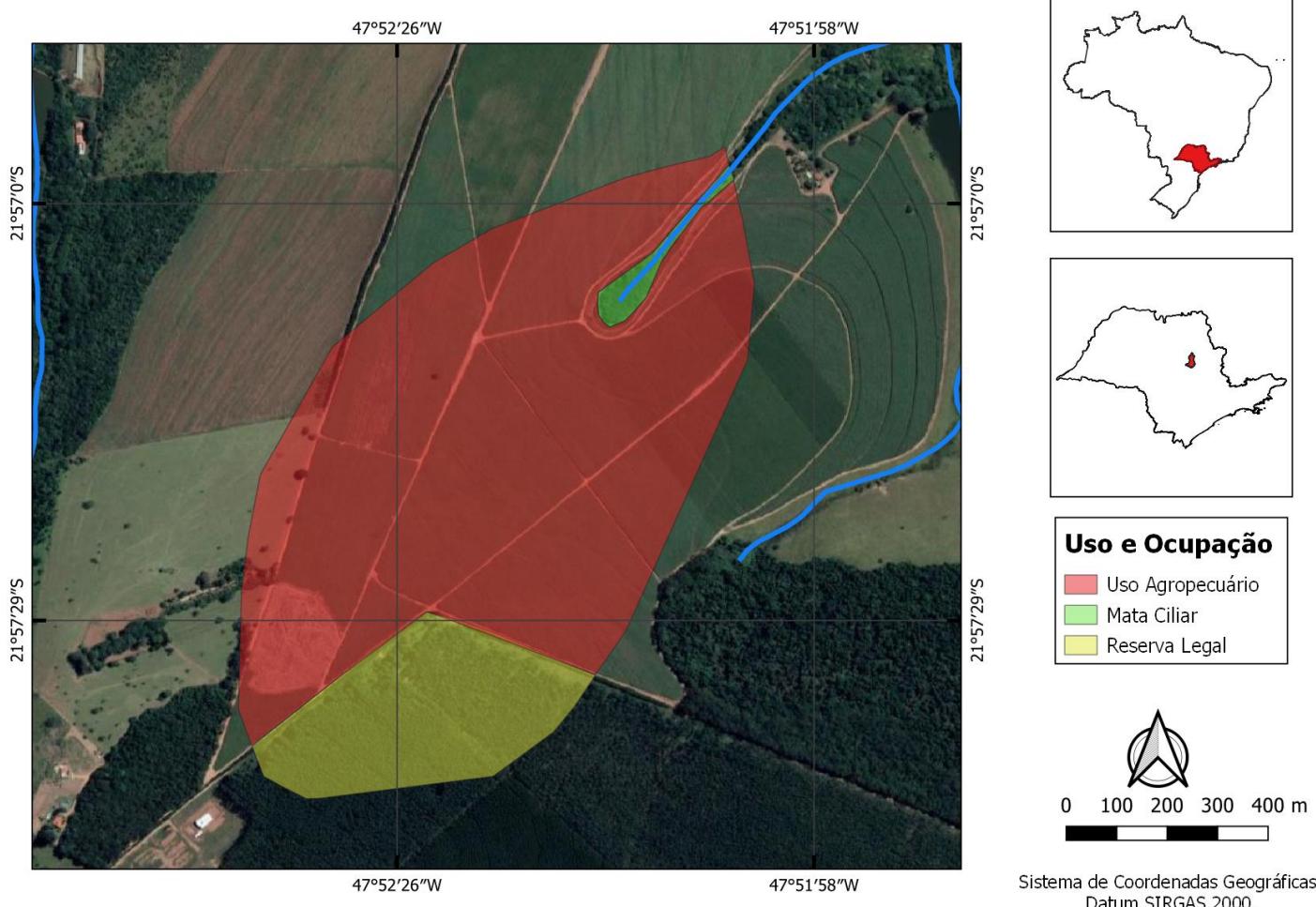
**Fonte:** Autoria própria

**Figura 3:** Uso e ocupação na microbacia do riacho Campus 2, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal



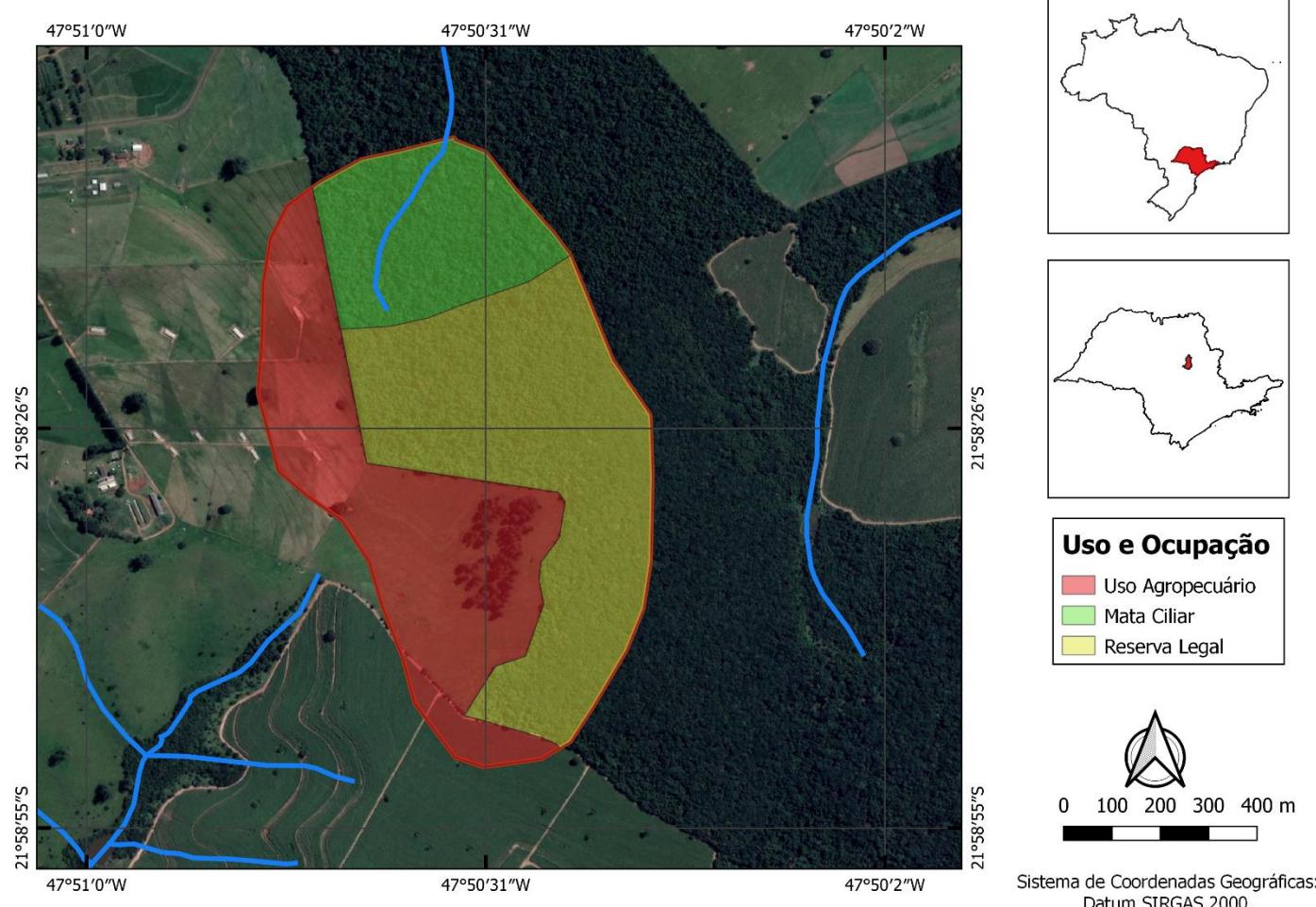
**Fonte:** Autoria própria

**Figura 4:** Uso e ocupação na microbacia do riacho Dagoberto, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal



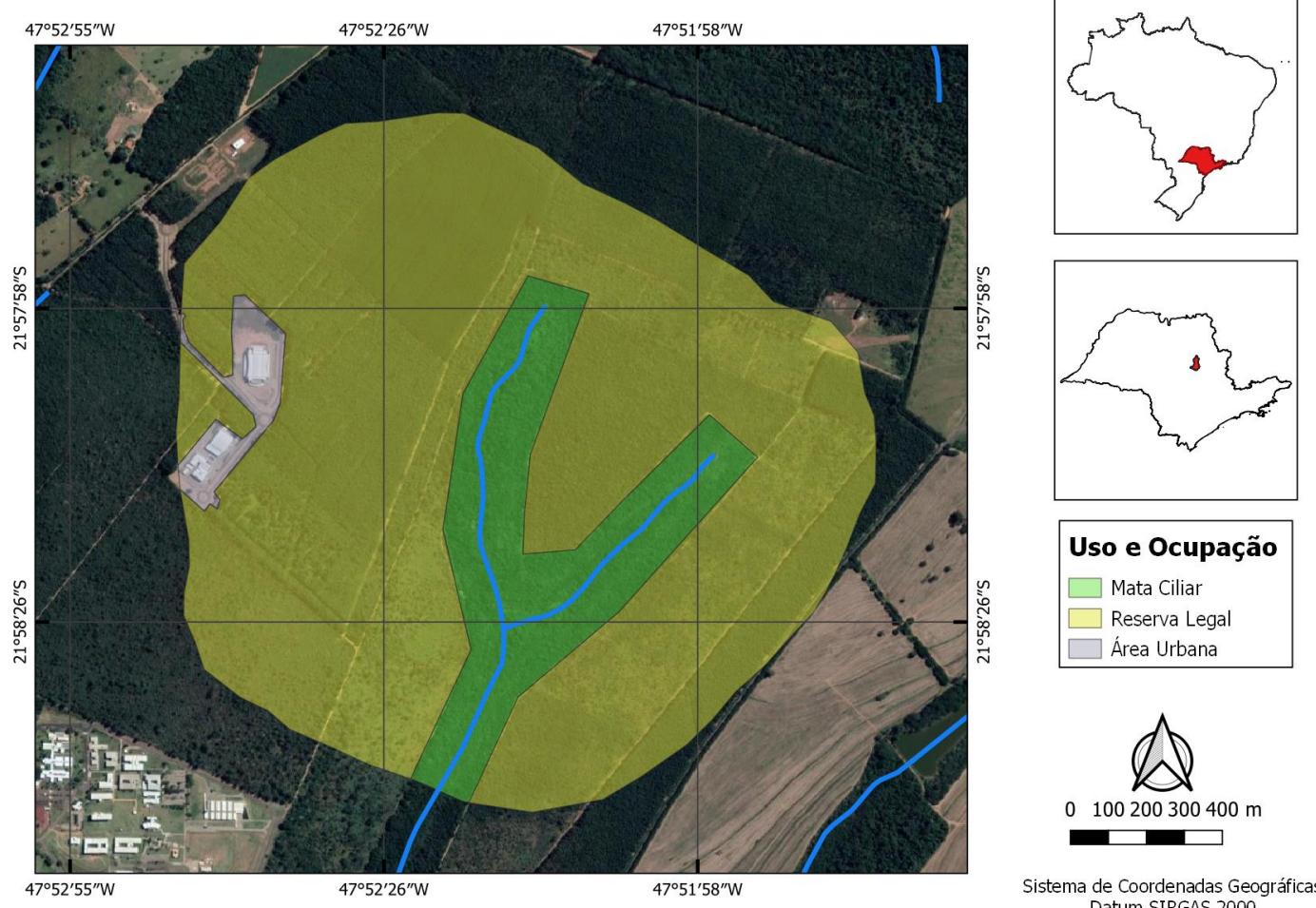
**Fonte:** Autoria própria

**Figura 5:** Uso e ocupação na microbacia do riacho Canchim, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal



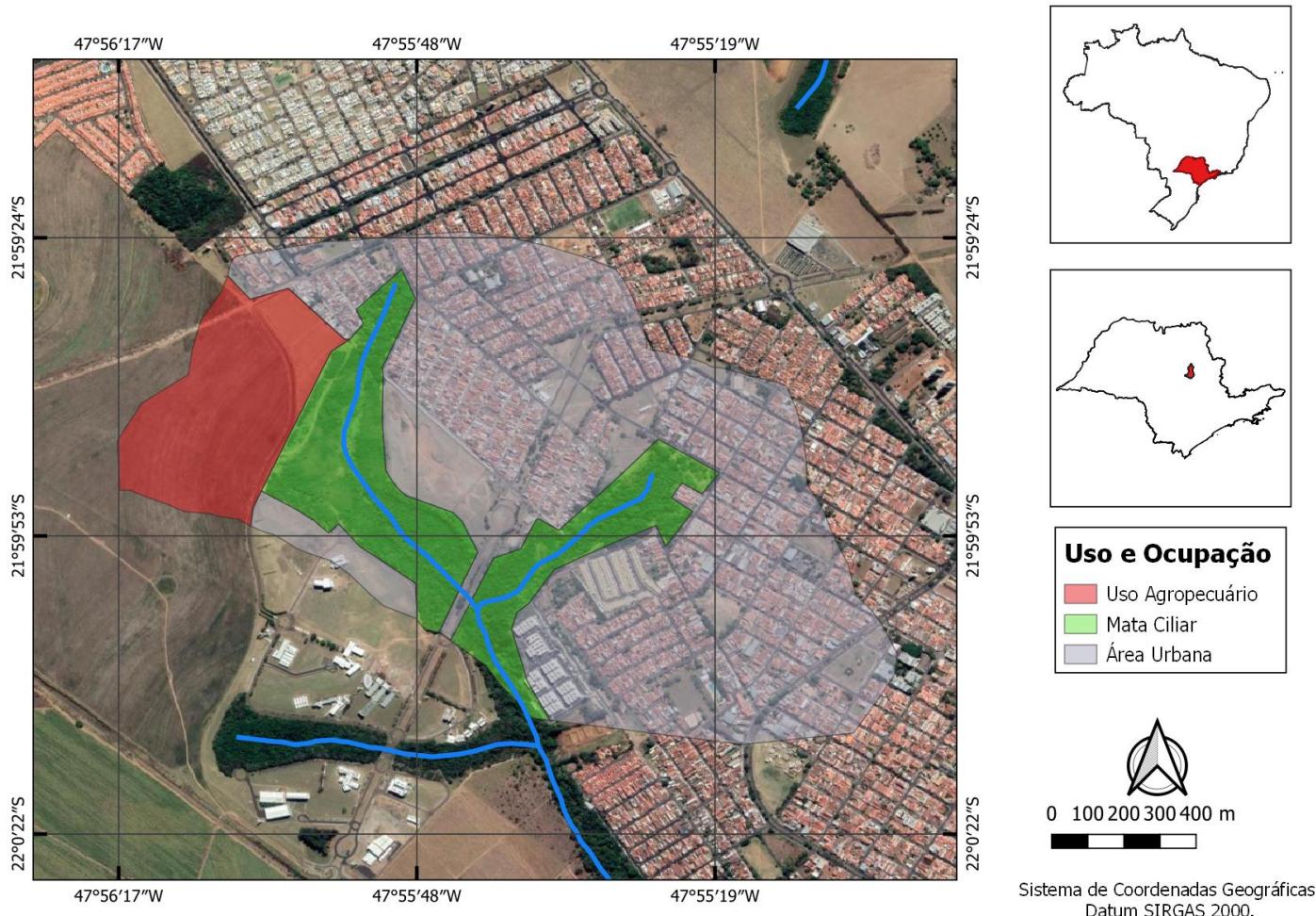
**Fonte:** Autoria própria

**Figura 6:** Uso e ocupação na microbacia do riacho Espraiado, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal



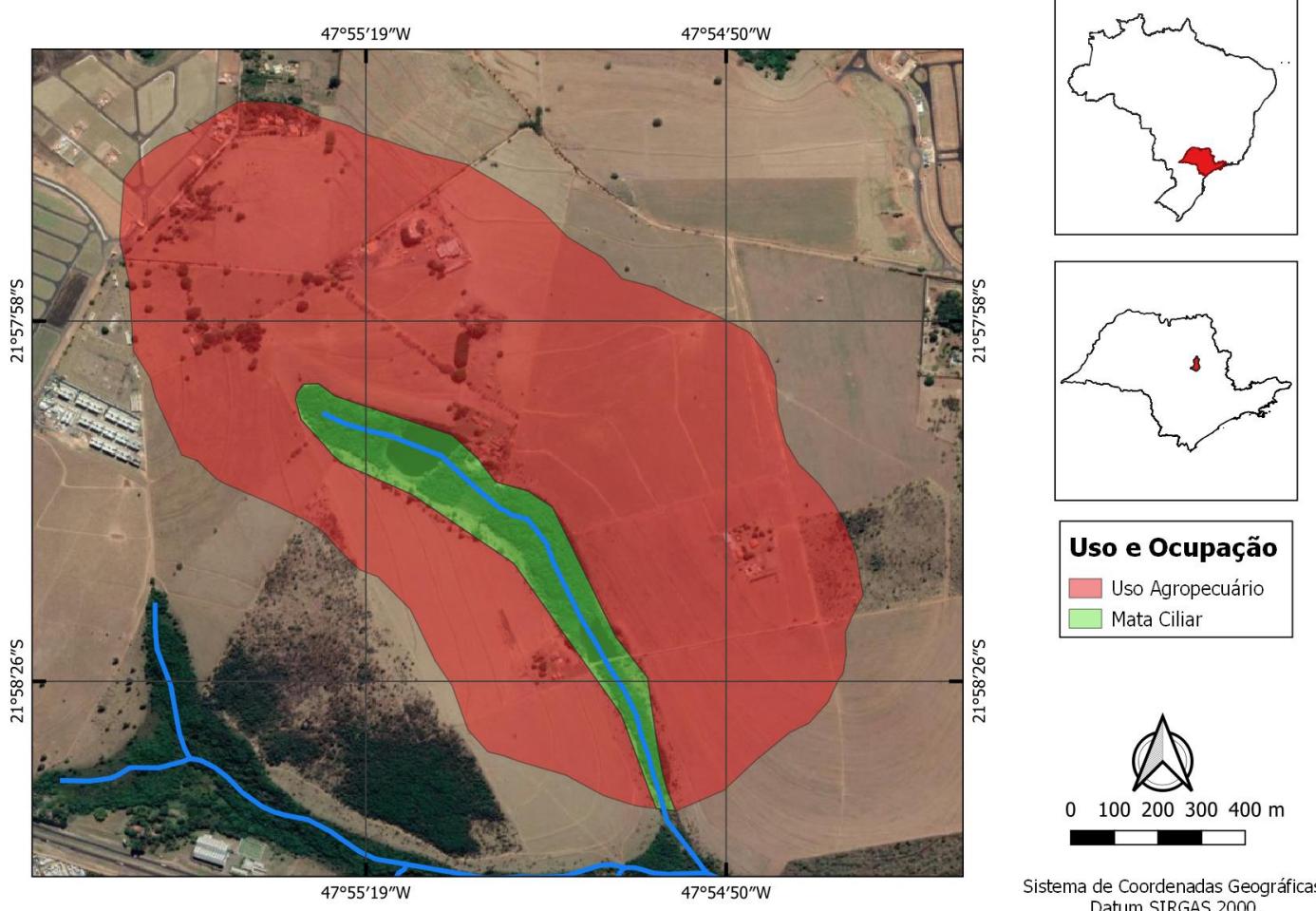
**Fonte:** Autoria própria

**Figura 7:** Uso e ocupação na microbacia do riacho Mineirinho, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal



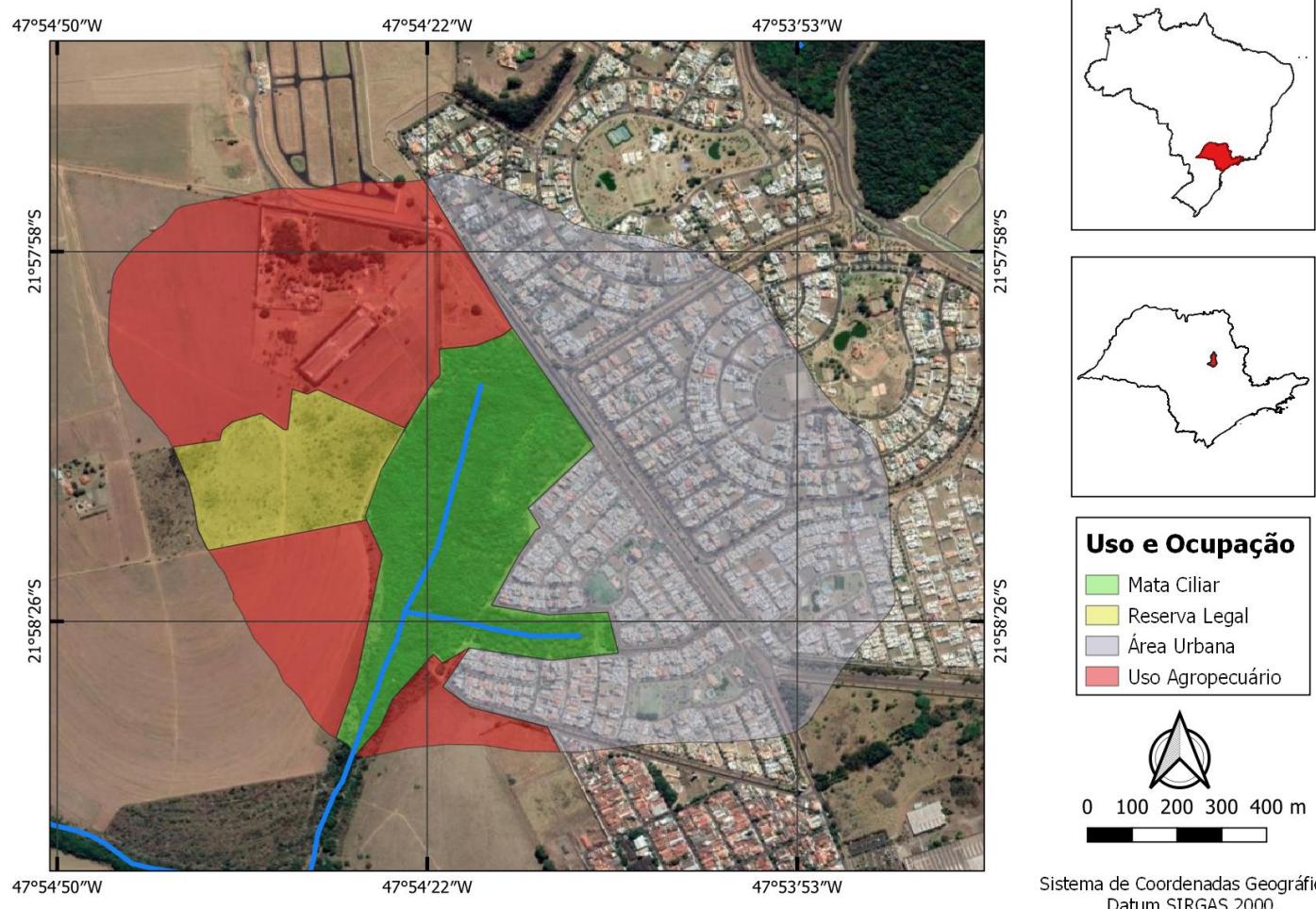
**Fonte:** Autoria própria

**Figura 8:** Uso e ocupação na microbacia do riacho Sete Irmãos I, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal



**Fonte:** Autoria própria

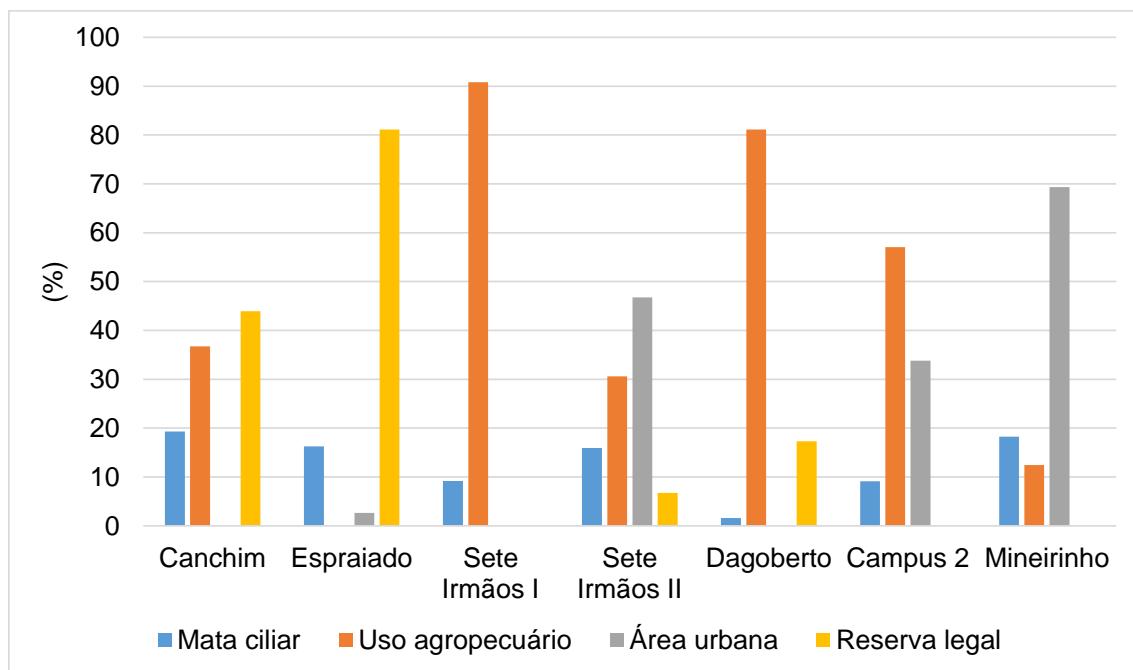
**Figura 9:** Uso e ocupação na microbacia do riacho Sete Irmãos II, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal



**Fonte:** Autoria própria

Com o auxílio das ferramentas de geoprocessamento, foi possível calcular as contribuições relativas das formas de uso e ocupação definidas anteriormente (mata ciliar, reserva legal, área urbana e uso agropecuário) (Figura 10).

**Figura 10:** Porcentagem do uso e ocupação do solo em cada microbacia dos riachos estudados, considerando-se as categorias mata ciliar, uso agropecuário, área urbana e reserva legal.



**Fonte:** Autoria própria

A porcentagem de uso agropecuário nas microbacias variou entre 0% (Espraiado) e 91% (Sete Irmãos I), com destaque também para as microbacias dos riachos Dagoberto e Campus 2, com 81% e 57% de uso agropecuário, respectivamente. Em relação à área urbana, a microbacia do riacho Mineirinho teve a maior porcentagem (69%), seguido da microbacia do riacho Sete Irmãos II (47%).

Nas microbacias dos riachos Espraiado e Canchim, a presença de vegetação foi maior que nas demais, com uma soma de mata ciliar e reserva legal totalizando 97% e 63% da área total, respectivamente. Por outro lado, as microbacias dos riachos Sete Irmãos I e Campus 2 apresentaram apenas cerca de 9% de área de mata ciliar e reserva legal cada uma.

De acordo com o Art. 4º da Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012 (BRASIL, 2012), foi calculada a APP mínima requerida para cada microbacia (Tabela 3).

Observa-se que apenas no riacho Dagoberto a área de mata ciliar requerida não é atendida e está em conflito com o que é preconizado pelo código florestal brasileiro. Portanto, esse ponto se encontra mais vulnerável à ocorrência dos agrotóxicos, visto que corpos d'água com uso intensivo de agricultura em suas margens tendem a estar mais vulneráveis ao aporte de tais poluentes (LEWIS, 2016). Foi observado em trabalhos anteriores que microbacias com a presença de mata ciliar ao longo dos cursos de água são menos suscetíveis à transferência de moléculas de agrotóxicos para águas superficiais (BORTOLUZZI et al., 2006; CHIARELLO et al. 2017).

**Tabela 3** - Área de mata ciliar das sete microbacias estudadas neste trabalho, e APP (Área de Preservação Permanente) mínima requerida de acordo com o código florestal brasileiro.

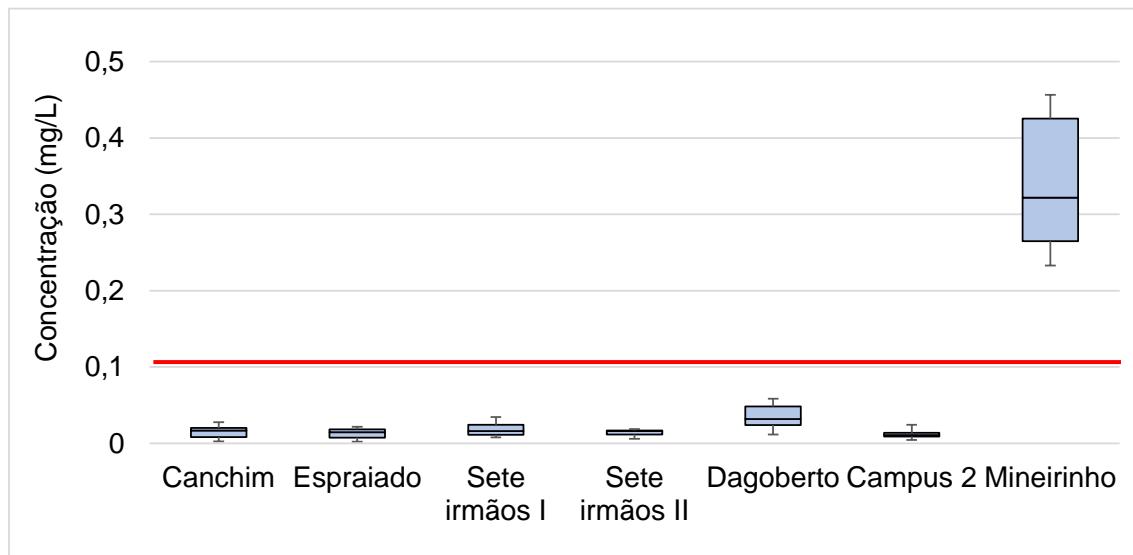
| Microbacia            | Área de mata ciliar observada (m <sup>2</sup> ) | APP mínima (m <sup>2</sup> ) |
|-----------------------|---|------------------------------|
| <b>Canchim</b>        | 151.236   | 29.073                       |
| <b>Espraiado</b>      | 442.085   | 138.880                      |
| <b>Sete Irmãos I</b>  | 161.335   | 83.700                       |
| <b>Sete Irmãos II</b> | 294.012   | 85.230                       |
| <b>Dagoberto</b>      | 14.669  | 25.145                       |
| <b>Mineirinho</b>     | 374.823   | 125.569                      |
| <b>Campus 2</b>       | 122.957   | 58.954                       |

**Fonte:** Autoria própria

## 5.2 Análise de nutrientes

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam as concentrações de nutrientes (amônio, ortofosfato e amônio) nos riachos em todas as coletas.

**Figura 11:** Síntese das concentrações (mg/L) de amônio analisadas nas coletas de fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020 nos riachos estudados. A concentração de referência atribuída por Cunha, Dodds e Calijuri (2011) representada pela linha em vermelho (0,1 mg/L). Os boxplots apresentam valores medianos, quartis 25% e 75%, além dos valores máximos e mínimos



**Fonte:** Autoria própria

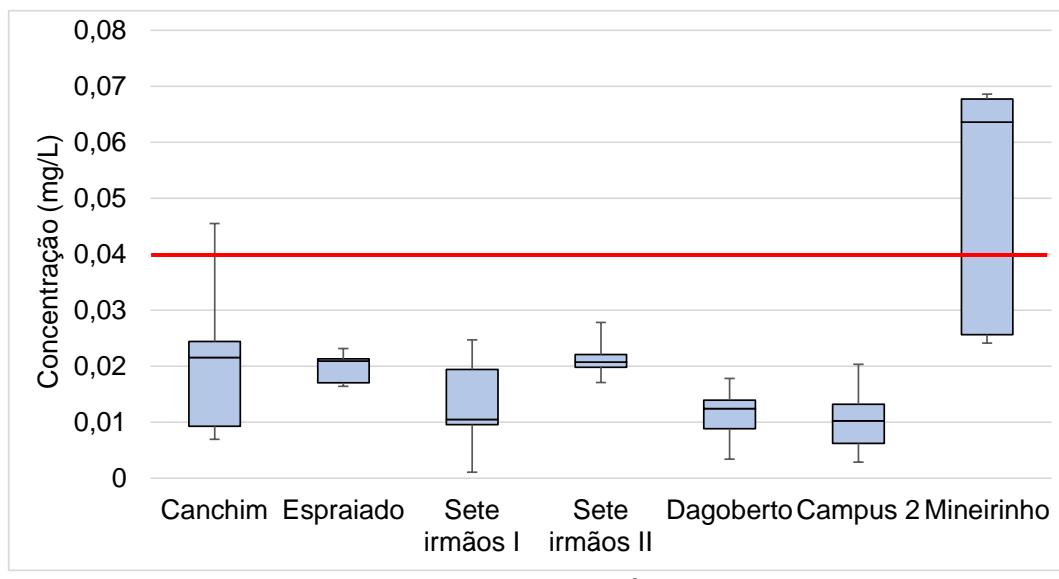
Conforme exposto na Figura 11, é possível perceber que a concentração de amônio nos riachos estudados variou entre 0,002 e 0,46 mg/L. As concentrações no riacho Mineirinho destoaram dos demais pontos, com uma concentração de amônio máxima de 0,46 mg/L e mínima 0,23 mg/L. O riacho com a segunda maior concentração de amônio (Dagoberto) teve máxima 0,06 mg/L e mínima 0,01 mg/L.

Segundo a Resolução CONAMA Nº 357 de 17/03/2005, as águas doces de classe 2 (na qual se enquadram os riachos estudados) devem seguir o padrão de nitrogênio amoniacal máximo de 3,7 mg/L. Considerando esse limite as concentrações de amônio de todos os pontos estudados se encaixam na faixa definida. Entretanto, Cunha, Dodds e Calijuri (2011) fizeram uma análise de mais de 28.000 dados de rios do estado de São Paulo obtidos pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) nas 22 UGHRLs do estado.

Os autores determinaram concentrações basais de nutrientes esperadas em condições naturais. Tais concentrações de referência em ambientes lóticos se compreenderam entre: 0,03 e 0,04 mg/L (fósforo total), 0,31 e 0,34 mg/L (nitrogênio total) e 0,06 e 0,10 mg/L (amônio). Portanto, para o amônio, todas as amostras do riacho Mineirinho não se enquadram nesta faixa definida, visto que a menor concentração analisada foi de 0,23 mg/L.

Episódios de lançamentos de esgoto “in natura” por vazamento da tubulação de esgoto ou ligações clandestinas ocorrem de forma frequente na microbacia do córrego Mineirinho. Assim, é possível observar na Figura 11 a discrepância entre as concentrações de amônio desse ponto e os demais riachos, visto que elevadas concentrações de amônio em cursos d’água geralmente estão diretamente ligadas à contribuição de águas residuárias.

**Figura 12:** Síntese das concentrações (mg/L) de ortofosfato analisadas nas coletas de fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020 nos riachos estudados. A concentração de referência atribuída por Cunha, Dodds e Calijuri (2011) representada pela linha em vermelho (0,04 mg/L). Os boxplots apresentam valores medianos, quartis 25% e 75%, além dos valores máximos e mínimos



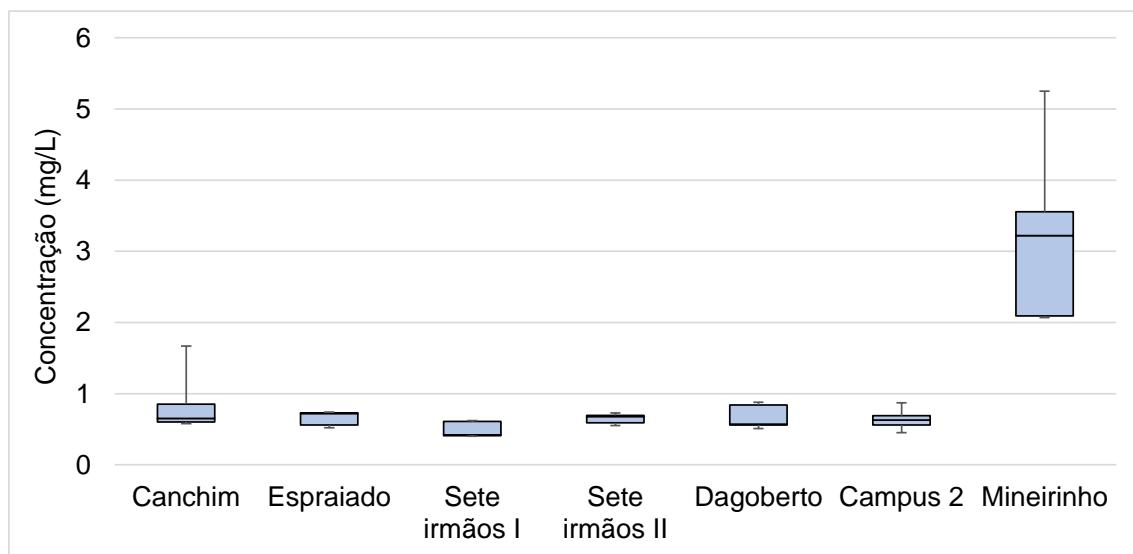
**Fonte:** Autoria própria

As concentrações de ortofosfato variaram entre 0,001 e 0,069 mg/L. As amostras coletadas no riacho Mineirinho apresentaram as maiores concentrações de ortofosfato, com um valor máximo de 0,069 mg/L e mínimo de 0,024 mg/L. A concentração dos demais riachos se compreendeu entre 0,001 e

0,028 mg/L, com exceção de uma amostra do riacho Canchim, que teve concentração de 0,045 mg/L.

O fósforo total corresponde à soma de diferentes parcelas, entre elas o ortofosfato. Portanto, a concentração de ortofosfato obrigatoriamente deve ser menor ou igual à de fósforo total. Desta forma, levando em consideração o limite de referência de fósforo total sugerido por Cunha, Dodds e Calijuri (2011), que foi 0,04 mg/L, é possível ver na Figura 12 que algumas amostras coletadas (principalmente do córrego Mineirinho) possuem concentrações de ortofosfato de 0,06 mg/L. E logo, excederam o limite de referência definido pelos autores.

**Figura 13:** Síntese das concentrações (mg/L) de nitrato analisadas nas coletas de fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020 nos riachos estudados. Os boxplots apresentam valores medianos, quartis 25% e 75%, além dos valores máximos e mínimos



**Fonte:** Autoria própria

Da mesma forma que analisado nas concentrações de amônio e ortofosfato, a concentração de nitrato no riacho Mineirinho destoou dos demais riachos, com concentrações entre 2,07 e 5,25 mg/L. Nos demais cursos d'água, as concentrações variaram entre 0,4 mg/L e 1,67 mg/L.

A Resolução CONAMA Nº 357 de 17/03/2005 define a concentração máxima de nitrato 10 mg/L para as águas doce de classe 2, portanto para esse parâmetro todas as concentrações de nitrato analisadas estão dentro do limite imposto, conforme Figura 13. Entretanto, da mesma maneira que ocorreu com os outros nutrientes analisados, o riacho Mineirinho novamente apresentou alta

discrepância dos demais pontos, possivelmente devido aos lançamentos de esgoto.

De forma geral, com exceção do riacho Mineirinho, as concentrações de nutrientes de todos os riachos foram bem próximas, independente da presença de culturas de cana-de-açúcar nas microbacias hidrográficas. Portanto, as matas ciliares presentes, mesmo que em alguns casos em extensões reduzidas, se mostraram importantes na atenuação de carreamento desses compostos aos riachos via escoamento superficial.

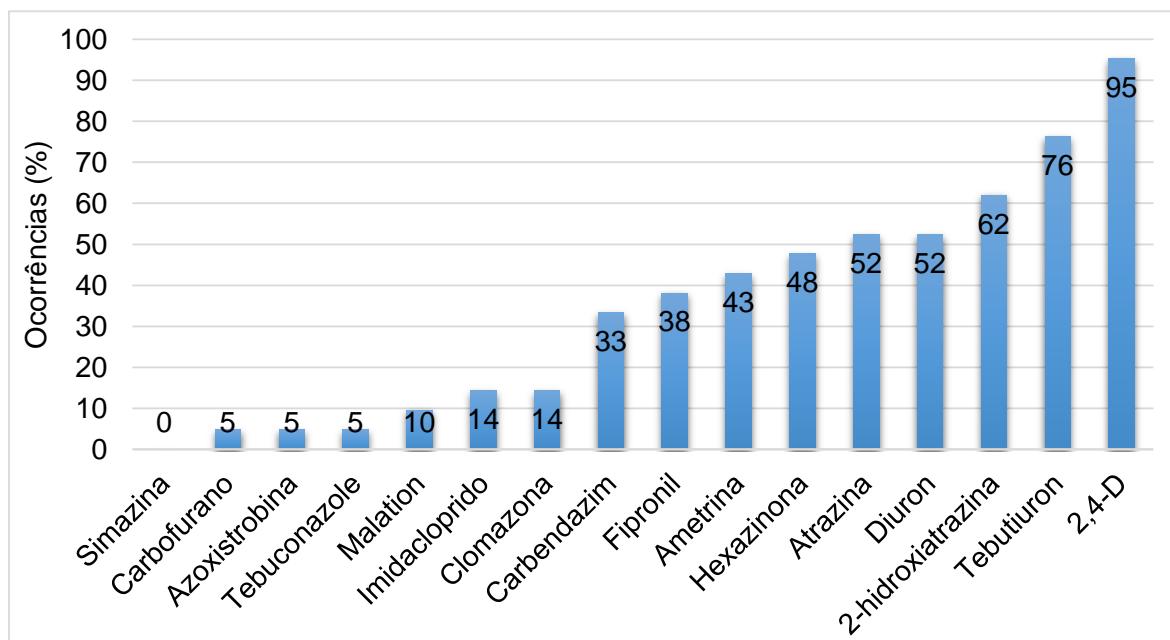
Weigelhofer et al. (2012) realizaram um estudo na Austrália buscando compreender a dinâmica de retenção de nutrientes em cursos d'água em locais com intensa atividade agrícola. Os autores concluíram que a mata ciliar conseguiu reduzir significativamente a transferência de nutrientes de bacias hidrográficas com elevado percentual de área agrícola para os riachos. Por outro lado, ainda segundo os pesquisadores, quando a vegetação ripária era menor ou ausente, uma quantidade muito maior de nutrientes foi transferida para os cursos d'água. Portanto, é ressaltada a importância de matas ciliares em microbacias com intensa atividade agrícola, assim como observado no presente estudo, visto que nestes locais é comum a adição de nutrientes no solo para manutenção das culturas e aumento da produtividade.

Bramley e Roth (2002) relacionaram os efeitos do uso do solo de bacias hidrográficas na qualidade da água de 37 riachos tropicais na Austrália. As áreas foram divididas majoritariamente em uso urbano e industrial, cultivo de cana, florestas e pastagem. Os autores concluíram que as concentrações de fósforo e nitrogênio nos rios aumentaram de forma significativa quando a proporção de culturas de cana na região de entorno era maior. No presente estudo, por sua vez, a influência da área urbana sobre o riacho Mineirinho pareceu ser preponderante sobre as concentrações dos nutrientes na água, possivelmente pelo lançamento de águas residuárias sem tratamento adequado.

### 5.3 Ocorrência de agrotóxicos

A porcentagem de ocorrência dos agrotóxicos avaliados foi compilada e organizada de forma crescente (Figura 14). Estão disponíveis os resultados das três coletas realizadas nos sete riachos, sendo assim o máximo de ocorrências possível é de 21 (100%). Vale ressaltar que algumas moléculas não foram quantificadas na terceira coleta, portanto para o cálculo da porcentagem apresentada na Figura 14 levou-se em consideração o número de vezes em que os compostos foram analisados.

**Figura 14:** Porcentagem da ocorrência de compostos em sete riachos da cidade de São Carlos-SP em coletas realizadas em fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020



**Fonte:** Autoria própria

O 2,4-D se mostrou o agrotóxico mais prevalente nas amostras, este composto foi encontrado em todos os riachos estudados e detectado 20 vezes (95,2% das amostras). Por esse motivo, foi escolhido para a realização de testes ecotoxicológicos durante o decorrer do projeto. Na Tabela 4, estão sintetizadas as médias das concentrações das moléculas com mais de 50% de ocorrência nas análises, enquanto as concentrações individuais de cada composto nas coletas se encontram nos Anexos A, B e C.

O tebutiuron foi detectado em todos os riachos e em todas as amostras, com exceção do riacho Canchim e Espraiado, que possuem maior área de reserva legal e mata ciliar em relação ao demais. Portanto, de forma preliminar, foi possível observar que esse agrotóxico foi prevalente nos riachos cujas bacias hidrográficas possuem maior área de uso ocupação de uso agropecuário e urbano.

**Tabela 4** - Concentração média ( $\eta\text{g L}^{-1}$ ) dos compostos com mais de 50% de ocorrência analisados nos riachos nas coletas de fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020

|                       | Concentração ( $\eta\text{g L}^{-1}$ ) |            |          |        |       |
|-----------------------|--|------------|----------|--------|-------|
|                       | 2-Hidroxiatrazina                      | Tebutiuron | Atrazina | Diuron | 2,4-D |
| <b>Espraiado</b>      | < 0,1                                  | < 0,1      | 1,8      | < 0,1  | 109,5 |
| <b>Dagoberto</b>      | 8,1                                    | 47         | 0,6      | 21,5   | 27,6  |
| <b>Sete Irmãos I</b>  | 6,3                                    | 13,5       | 11,1     | 2,1    | 79,1  |
| <b>Sete Irmãos II</b> | 11,5                                   | 6,7        | 10,2     | 1,9    | 11,7  |
| <b>Mineirinho</b>     | 2,4                                    | 4,4        | 6        | 4,1    | 30,5  |
| <b>Canchim</b>        | 0,1                                    | 0,1        | 1,6      | < 0,1  | 81    |
| <b>Campus 2</b>       | 2,9                                    | 5,5        | 2,7      | 0,1    | 32,7  |
| <b>Média global</b>   | 4,5                                    | 11,0       | 4,9      | 4,2    | 53,2  |

**Fonte:** Autoria própria

O agrotóxico 2,4-D apresentou a maior média global de concentração durante todo o período de estudo ( $53,17 \eta\text{g L}^{-1}$ ), seguido da hexazinona ( $49,4 \eta\text{g L}^{-1}$ ), e do tebutiuron ( $11,0 \eta\text{g L}^{-1}$ ).

A hexazinona, apesar de possuir apenas 48% de prevalência nas amostras ambientais (Figura 14), foi a segunda molécula com maior média global de concentração. Esta molécula foi detectada em diversas amostras em elevadas concentrações no riacho Dagoberto, onde possuiu uma prevalência de 100%, com uma concentração média de  $195,1 \eta\text{g L}^{-1}$ .

Em relação ao agrotóxico mais prevalente nas amostras (2,4-D), na Tabela 4 é possível perceber que nos riachos Espraiado, Canchim e Sete Irmãos I as maiores concentrações médias deste composto foram observadas. Portanto, apesar de maior presença de vegetação nessas microbacias, o 2,4-D foi detectado em altas concentrações, sugerindo que o herbicida possui alta

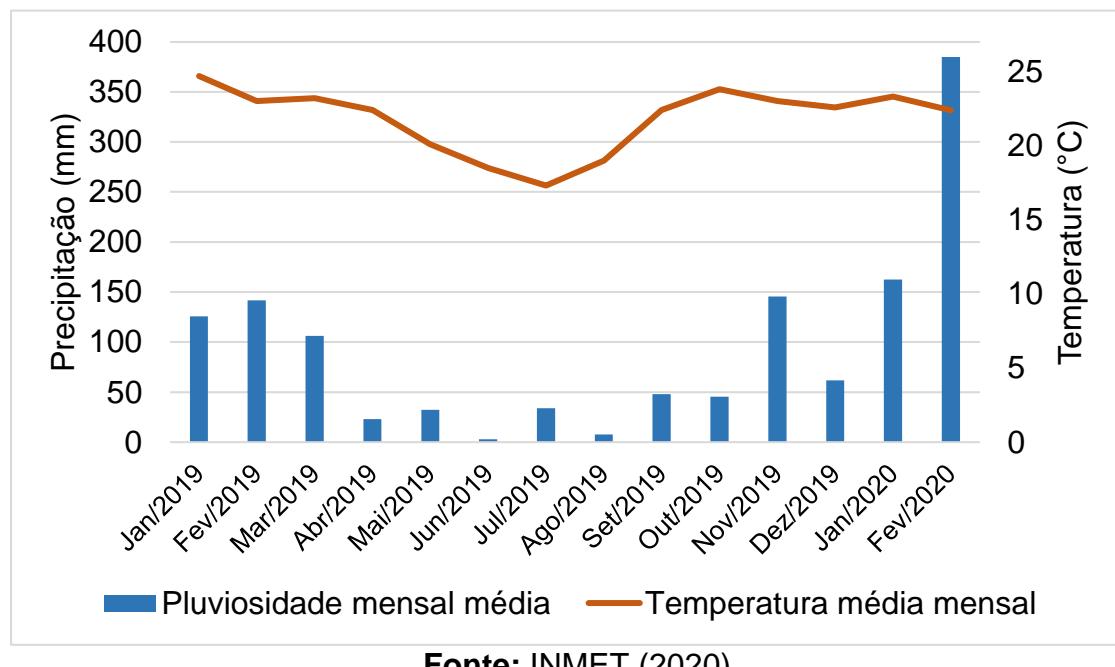
disseminação no meio ambiente e sua presença em áreas mais preservadas precisa ser investigada.

Entre os fatores que podem justificar a presença do 2,4-D nos riachos com as microbacias com elevada presença de mata ciliar e reserva legal, está a dispersão de agrotóxicos pela ação do vento, que dependendo do método de aplicação e condições metereológicas pode carregar agrotóxicos por elevadas distâncias (LANGENBACH et al., 2017; VILLIOT et al., 2018). Um dos principais fatores que causa esse processo é o carregamento de pequenas partículas de poeira pelo vento, podendo se depositar em locais distantes de sua posição inicial, proporcionando a dispersão de agrotóxicos que se encontram nessas partículas (DEVARREWAERE et al., 2016).

Portanto, visto que a região de entorno possui vasta área de culturas de cana-de-açúcar em todo seu entorno, este processo pode ser uma das causas da alta prevalência de alguns agrotóxicos em microbacias com ausência de uso agropecuário.

Dados climatológicos da região de São Carlos foram levantados como uma ferramenta adicional para analisar os resultados como informação complementar (Figura 15).

**Figura 15:** Dados climatológicos da região de São Carlos durante o período de realização das coletas (janeiro de 2019 a fevereiro de 2020)



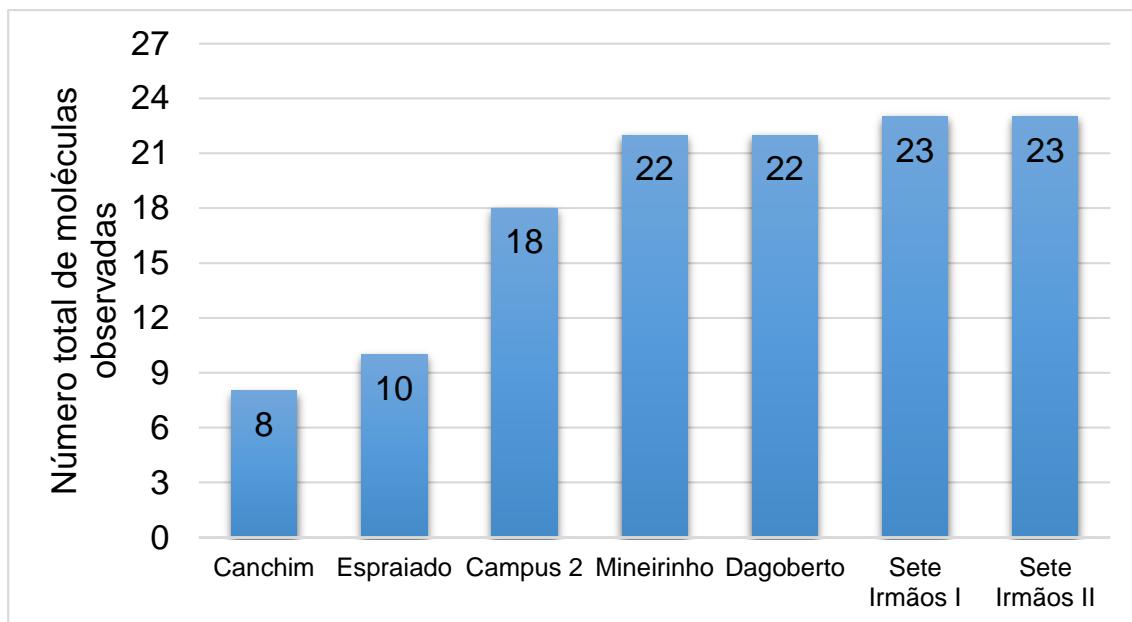
**Fonte:** INMET (2020)

É possível analisar na Figura 15 que a temperatura média variou entre 17,3 °C no mês mais frio (julho/2019), e 24,7 °C no mês mais quente (janeiro/2020). Além disso, fevereiro/2019 foi o mês com maior precipitação no período observado (384,7 mm), e junho/2019 com a menor precipitação (2,8 mm), totalizando 1321,4 mm nesses 14 meses.

A ocorrência de agrotóxicos possuiu maior prevalência nas coletas de fevereiro/2019 e janeiro/2020. Analisando a Figura 15, é possível observar que de forma geral as moléculas apresentaram maior ocorrência nas amostras durante o período chuvoso. Este resultado ocorreu muito provavelmente devido aos eventos de precipitação intensificarem o carreamento de agrotóxicos aos riachos de forma significativa (SANCHEZ-BAYO; HYNE, 2011).

O número de moléculas de agrotóxicos observadas em cada riacho foi compilado de forma crescente (Figura 16). Estão disponíveis os resultados das três coletas realizadas, portanto o número máximo de ocorrências possível é de 48 (100%), visto que foram quantificados 16 agrotóxicos em cada coleta.

**Figura 16:** Número de moléculas encontradas em cada riacho considerando as coletas de fevereiro/2019, julho/2019 e janeiro/2020



**Fonte:** Autoria própria

A partir da Figura 16, podem-se destacar os pontos em que os agrotóxicos foram detectados de maneira mais prevalente, sendo esses: Sete Irmãos I = Sete

Irmãos II > Dagoberto = Mineirinho > Campus 2 > Espraiado > Canchim. A partir da Figura 10, observa-se que as microbacias hidrográficas desses riachos apresentam, majoritariamente, áreas de uso agropecuário e área urbana, enquanto os pontos em que foram identificados menor número de detecção de agrotóxicos nas amostras (Canchim e Espraiado) constituem boa parte da sua área de mata ciliar e reserva legal.

Desta forma os resultados observados no presente trabalho corroboram com o obtido por trabalhos anteriores, em que microbacias com a presença de mata ciliar ao longo dos cursos de água são menos suscetíveis à transferência de moléculas de agrotóxicos para águas superficiais (LEWIS, 2016; BORTOLUZZI et al., 2006; CHIARELLO et al. 2017). Visto que, nos riachos Canchim e Espraiado a prevalência de agrotóxicos encontrados destoou de forma significativa dos demais pontos.

Vale ressaltar que as coletas foram realizadas apenas de amostras de água, e que, geralmente amostras do sedimento tendem a apresentar maiores concentrações de agrotóxicos, devido à retenção de agrotóxicos em partículas sólidas (Li et al., 2015; Gamble, 2009). Os agrotóxicos organoclorados (e.g. 2,4-D) são facilmente absorvidos por partículas devido ao seu alto coeficiente de partição etanol-água (Zhao et al., 2009), e possuem uma maior persistência no meio ambiente, podendo permanecer em cursos d'água por mais de 20 anos (Zhao et al., 2009; Sapozhnikova et al., 2004).

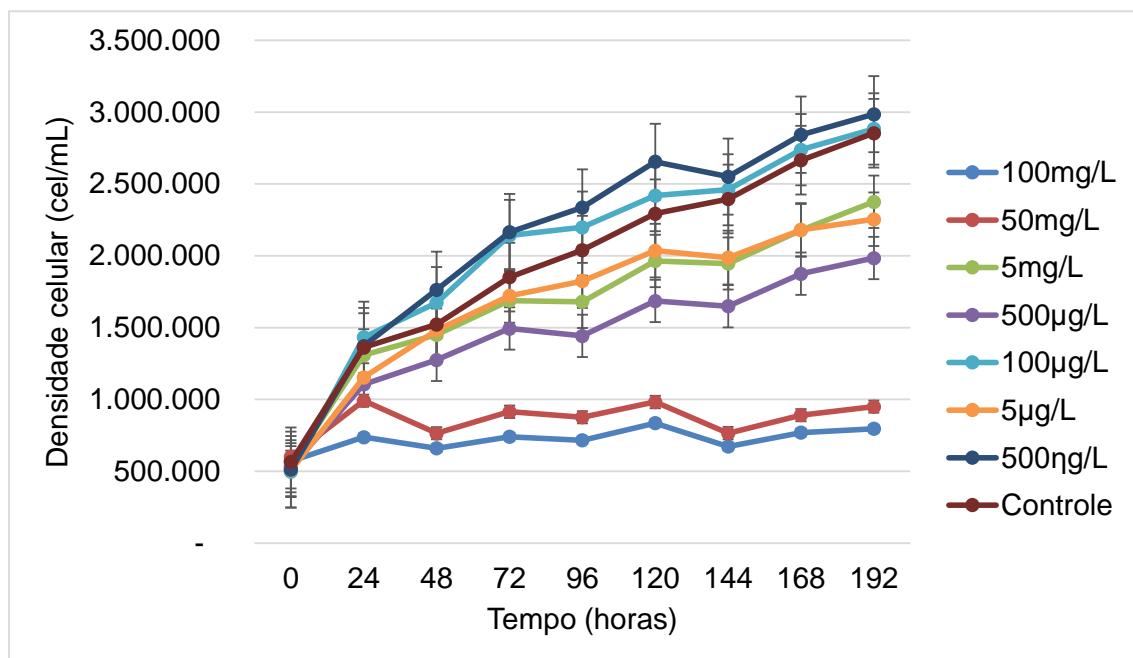
Moléculas de agrotóxicos quando retidas em sedimentos de reservatórios ou cursos d'água podem apresentar elevada periculosidade ambiental. Isto ocorre devido o sedimento possuir papel fundamental no transporte de contaminantes, que podem apresentar ameaças à biota aquática, tanto à organismos produtores primários, quanto de outros níveis tróficos. Assim, a presença de agrotóxicos já em amostras de água se torna mais preocupante, visto que pode ser indício de uma contaminação ambiental mais severa e pode apresentar riscos ao ecossistema aquático.

## 5.4 Testes ecotoxicológicos

Nos testes de sensibilidade da *Raphidocelis subcapitata* à substância de referência (NaCl), realizados por Diniz et al. (2020), obteve-se  $IC_{50-96h} = 3,2\text{ g L}^{-1}$  para a taxa de crescimento, valores próximos aos reportados por Casali-Pereira (2013) e Melo (2016) para o mesmo organismo teste ( $3,5\text{ g L}^{-1}$  e  $3,7\text{ g L}^{-1}$ , respectivamente).

Na Figura 17, está sintetizada a evolução temporal das densidades celulares para todas as concentrações de 2,4-D testadas. Os resultados estatísticos obtidos se encontram na Figura 18 e Anexo D, que apresentam, respectivamente, um gráfico boxplot que reúne todos os resultados obtidos durante os ensaios e um teste post-hoc de Tukey. Os resultados da produção de clorofila-a após 8 dias estão sintetizados na Figura 19.

**Figura 17:** Densidade celular de *Raphidocelis subcapitata* (cel/mL) para todas as concentrações de 2,4-D testadas nos ensaios ecotoxicológicos. A intensidade de absorbância foi mensurada a cada 24 h durante 8 dias e correlacionada à densidade celular por meio de curva de calibração específica



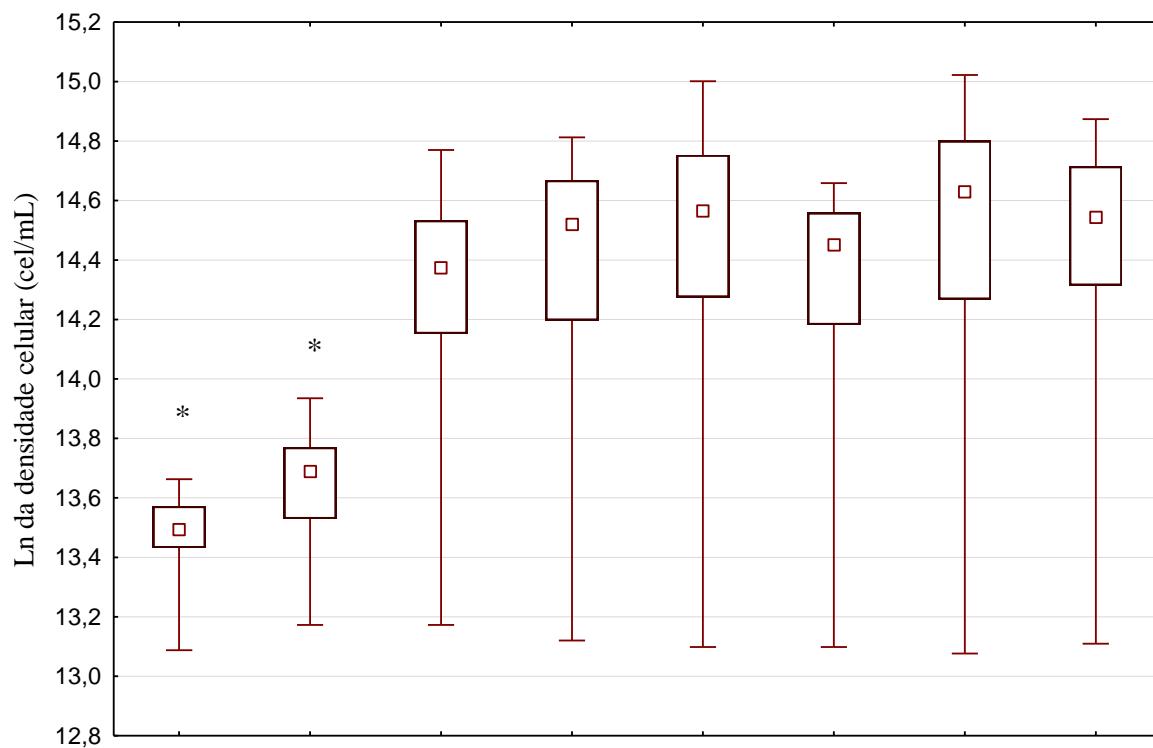
**Fonte:** Autoria própria

Conforme ilustrado na Figura 17, é possível ver que o crescimento da densidade celular das concentrações testadas de 50 e 100 mg/L foi completamente diferente das demais concentrações.

Quando comparadas com o controle, as concentrações de 500  $\text{ng/L}$  e 100  $\mu\text{g/L}$  apresentaram densidades celulares muito semelhantes durante os 8 dias de teste, enquanto as demais tiveram um menor crescimento. Embora as concentrações de 5  $\text{mg/L}$ , 500  $\mu\text{g/L}$  e 5  $\mu\text{g/L}$  apresentarem uma variação no crescimento da densidade celular, em relação ao controle, só foi observada diferença significativa ( $p<0,05$ ) para as concentrações de 50 e 100  $\text{mg/L}$ .

As maiores densidades celulares foram observadas no último dia dos ensaios, sendo elas: 2.985.261, 2.883.308 e 2.852.901 cel/mL, para as concentrações de 500  $\text{ng/L}$ , 100  $\text{ng/L}$  e o controle, respectivamente.

**Figura 18:** Ln das densidades celulares de todas as concentrações durante os 8 dias dos testes ecotoxicológicos; \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA seguida por teste post-hoc de Tukey) na síntese dos resultados observados das concentrações em comparação com o controle.

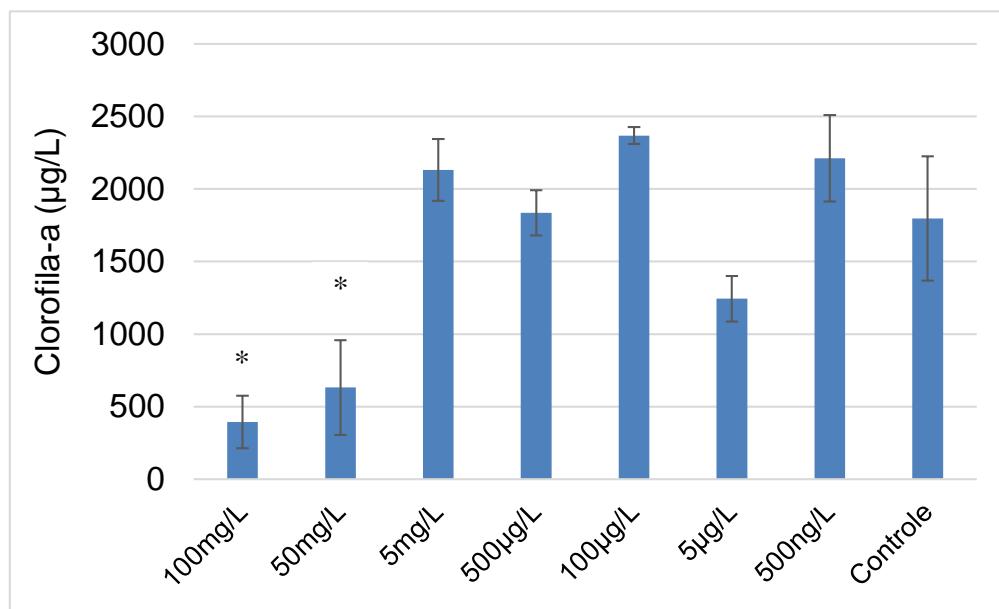


**Fonte:** Autoria própria

Observando a Figura 18 e Anexo D é possível inferir que a densidade celular nos testes foi significativamente inibida ( $p<0,05$ ) pelas concentrações de 50 e 100  $\text{mg L}^{-1}$  em comparação com o grupo controle. As demais concentrações testadas não apresentaram diferença estatística significativa.

O 2,4-D também inibiu de forma significativa ( $p<0,05$ ) a produção de clorofila-a nas concentrações de 50 e 100 mg  $L^{-1}$  (Figura 19). As maiores concentrações de clorofila-a foram observadas nas amostras com concentração de 2,4-D de 500  $\mu\text{g/L}$ , 100  $\mu\text{g/L}$ , 5mg/L e no controle.

**Figura 19:** Médias das concentrações de clorofila-a da microalga *Raphidocelis subcapitata* em micrograma por litro ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) após 8 dias de exposição para todas as concentrações de 2,4-D testadas nos ensaios ecotoxicológicos; \* indica diferença significativa ( $p < 0.05$ , ANOVA seguida por teste post-hoc de Tukey) na síntese dos resultados observados das concentrações em comparação com o controle.



**Fonte:** Autoria própria

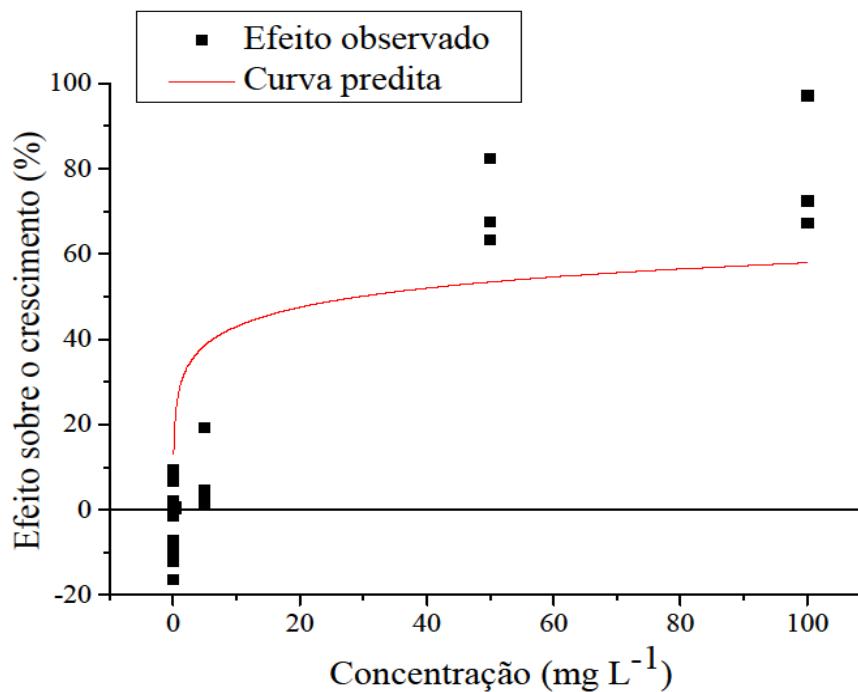
O 2,4-D pertence ao grupo dos clorofenóis, classe de substâncias considerada perigosa para o meio ambiente e a saúde humana (GARCÍA-CRUZ et al., 2010). Um dos efeitos deste herbicida é o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando desequilíbrio entre a produção e remoção das EROs, somado à indução de algumas atividades enzimáticas (SONG, 2014).

Além disso, o 2,4-D afeta a integridade da membrana celular de forma direta, fazendo com que xenobióticos consigam entrar de forma mais fácil nas células e produzam efeitos tóxicos em seu interior (Martínez-Ruiz; Martínez-Jerônimo, 2018). O herbicida é um produto químico reconhecido como disruptor endócrino com elevada toxicidade e persistente em ambientes aquáticos, sendo frequentemente encontrado em águas superficiais (SHANKAR et al., 2006). Portanto, o mecanismo de ação do 2,4-D provoca alterações metabólicas e

bioquímicas que levam a morte celular. Em relação à saúde humana, o herbicida é teratogênico, carcinogênico, tóxico para o sistema reprodutivo e provoca distúrbios hormonais (FRIEDRICH, 2014). Nesse sentido, os resultados obtidos na presente pesquisa podem servir de base para estudos futuros a respeito dos riscos ambientais e à saúde humana associados ao 2,4-D.

A Figura 20 mostra a curva do efeito do 2,4-D sobre o crescimento da *Raphidocelis subcapitata*. O  $IC_{50-196h}$  foi de 29,4 mg/L para um  $R^2$  de 0,65. Comparou-se o resultado obtido com outros resultados sintetizados na Tabela 5.

**Figura 20:** Curva predita sobre o efeito de inibição de crescimento da microalga *Raphidocelis subcapitata* causada por diferentes concentrações do agrotóxico 2,4-D



**Fonte:** Autoria própria

**Tabela 5** - Valores de  $IC_{50-196h}$  observados por outros autores que realizaram testes ecotoxicológicos com diversas microalgas, utilizando o agrotóxico 2,4-D isolado. \* indica que efeitos de inibição de crescimento algal não foram observados para as concentrações testadas.

| Microalga                        | $IC_{50}$ (mg L <sup>-1</sup> ) | Autores                                  |
|----------------------------------|---------------------------------|--|
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 20                              | (Wong; Chang, 1988)                      |
| <i>Ankistrodesmus falcatus</i>   | 1353,8                          | (Martínez-Ruiz; Martínez-Jerônimo, 2018) |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i>   | 20                              | (Wong, 2000)                             |
| <i>Oophila amblystomatis</i>     | 79                              | (Nema; Hanson; Müller, 2018)             |
| <i>Scenedesmus obliquus</i>      | *                               | (Zhu et al., 2016)                       |
| <i>Raphidocelis Subcapitata</i>  | *                               | (Moreira et al., 2020)                   |

Analizando a Tabela 5, é possível perceber que o 2,4-D causou efeitos de inibição de crescimento de algas apenas na ordem de mg L<sup>-1</sup>. O mesmo foi observado no presente trabalho, já que não foram observadas diferenças significativas de crescimento ao se compararem as concentrações menores (ng L<sup>-1</sup> e  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) ao controle.

Apesar da elevada  $IC_{50}$  reportada por Martínez-Ruiz e Martínez-Jerônimo (2018) (Tabela 5), os autores observaram alterações causadas pelo 2,4-D na membrana celular, causando a entrada de xenobióticos no interior da microalga e produzindo efeitos tóxicos em seu interior. Também foram observadas deficiências na formação da produção celular e aumento da concentração de lipídios no citoplasma.

Os ensaios ecotoxicológicos realizados por Zhu et al. (2016) não apontaram redução no crescimento algal da microalga *Scenedesmus obliquus* para nenhuma concentração testada (2  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 20  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 200  $\mu$ g L<sup>-1</sup> e 2,0 mg L<sup>-1</sup>). Entretanto foi observado que o agrotóxico causou alteração na morfologia celular, e reduziu a atividade fotossintética da alga de forma significativa ( $p<0,05$ ).

O mesmo ocorreu nos ensaios feitos por Moreira et al. (2020), em que não foi observada inibição na taxa de crescimento nas concentrações testadas do 2,4-D isolado (30  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 70  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 150  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 350  $\mu$ g L<sup>-1</sup> e 500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>). Entretanto, foram observados efeitos em outros parâmetros analisados durante os ensaios (aumento da fluorescência da clorofila-a e alteração da morfologia celular). Vale ressaltar que este agrotóxico, mesmo em baixas concentrações pode interagir

com outros compostos, causando efeitos sinérgicos e aumentando a toxicidade em algas (MOREIRA et al., 2020).

Os testes ecotoxicológicos realizados nesta pesquisa e por todos autores citados são fundamentais para a compreensão dos possíveis impactos do 2,4-D em ambientes aquáticos. Entretanto, ainda é preciso avançar no conhecimento da toxicidade de múltiplos componentes encontrados no meio ambiente, visto que é comum que seja encontrada, nos cursos d'água, uma mistura de compostos que podem causar efeitos sinérgicos ou antagônicos aos organismos aquáticos (MEYER-BARON et al., 2015).

## 6 CONCLUSÕES

Todos os riachos estudados tiveram amostras com ocorrências de agrotóxicos prevalentes durante todo o período de estudo, sendo o 2,4-D o composto que apresentou maior prevalência nas amostras, com cerca de 95% de ocorrência durante as coletas realizadas. Devido a alta prevalência de alguns agrotóxicos nas amostras ambientais, a presença de estudos quantificando as concentrações de agrotóxicos nos sedimentos evicenciam-se muito importantes, de forma a buscar compreender de forma mais completa a ocorrência de agrotóxicos no ecossistema aquático como um todo.

O uso agropecuário nas microbacias hidrográficas foi um fator determinante para a ocorrência de agrotóxicos nos riachos. Entretanto, de forma preliminar, matas ciliares e reservas legais mais extensas pareceram atenuar a presença de agrotóxicos nos riachos.

Com exceção do riacho Mineirinho, devido lançamentos de esgoto “in natura” em sua bacia hidrográfica, as análises de nutrientes de todos os riachos estavam em conformidade com valores de referência estudados em trabalhos anteriores, apesar da presença de culturas de cana-de-açúcar próximas aos riachos. Isto ocorreu, provavelmente, devido a presença de mata ciliar nas microbacias, que atenuou o carreamento de nutrientes aos riachos.

Os testes de ecotoxicidade realizados a partir da exposição da microalga *Raphidocelis subcapitata* ao herbicida 2,4-D mostraram efeitos de inibição de crescimento de densidade celular e síntese de clorofila-a nas concentrações de 100 e 50 mg L<sup>-1</sup>, indicando os efeitos negativos que este agroquímico causa em

organismos não-alvo. Apesar dessas concentrações elevadas possivelmente não ocorrerem em condições naturais, pouco se sabe sobre os efeitos sinérgicos causados pelas diversas moléculas de agrotóxicos encontradas nas amostras ambientais, mesmo em baixas concentrações.

Portanto, dado o atual cenário de uso excessivo de agrotóxicos e número crescente de registros de novos ingredientes ativos no país, evidencia-se a importância da continuidade de estudos que avaliem o comportamento destes produtos no ambiente e sua relação com os organismos vivos, a fim de estimar os riscos diretos e indiretos aos ecossistemas aquáticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRASCO, DOSSIÊ ABRASCO: **Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde**, 2012.
- ACAYABA, Raphael D.'Anna et al. Occurrence of pesticides in waters from the largest sugar cane plantation region in the world. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 9824-9835, 2021.
- ALBUQUERQUE, A. F., RIBEIRO, J. S., KUMMROW, F., NOGUEIRA, A. J. A., MONTAGNER, C. C., & UMBUZEIRO, G. A.. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, 2016.
- APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 22nd ed.; American Water Works Assn: Washington, DC, USA, 2012.
- ARIAS, Ana Rosa Linde et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 61-72, 2007.
- ARMAS, Eduardo Dutra. **Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) na sub-bacia do rio Corumbataí**. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- BENEDINI, Mauro S., ARRIGONI, Enrico de B. Manejo integrado de pragas de solo na cana-de-açúcar. **Revista Copiana**. nº 47, maio de 2008.
- BEULKE, Sabine et al. User subjectivity in Monte Carlo modeling of pesticide exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**: An International Journal, v. 25, n. 8, p. 2227-2236, 2006.
- BLAISE, Christian; VASSEUR, Paule. Algal microplate toxicity test. In: **Small-scale freshwater toxicity investigations**. Springer, Dordrecht. p. 137-179, 2005.
- BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R.; COPETTI, A. C. C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.10, n. 4, p. 881-887, 2006.
- BRAMLEY, R. G. V.; ROTH, C. H. Land-use effects on water quality in an intensively managed catchment in the Australian humid tropics. **Marine and Freshwater Research**, v. 53, n. 5, p. 931-940, 2002.
- BRASIL. **Lei nº 12.651**, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa, Brasília, DF, 2012.
- BROWNE, Amanda M.; MOORE, Paul A. **The effects of sublethal levels of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide (2, 4-D) on feeding behaviors of the crayfish *O. rusticus***. Archives of environmental contamination and toxicology, v. 67, n. 2, p. 234-244, 2014.
- CANASAT. Monitoramento da cana-de-açúcar via imagens de satélite. **Mapa do Cultivo**., 2013.
- CARRIQUIRIBORDE, Pedro et al. **Aquatic risk assessment of pesticides in Latin America**. Integrated environmental assessment and management, v. 10, n. 4, p. 539-542, 2014.
- Casali-Pereira, M. P. 2013. **Efeitos do agrotóxico Vertimec 18 EC para o zooplâncton e fitoplâncton: análises laboratoriais com o produto comercial**

**e amostras de mesocosmos artificialmente contaminados.** Universidade de São Paulo. 2013.

CHAVES, Marisa de Jesus Silva et al. Eficiência e Robustez na Determinação do Herbicida 2, 4-D em Águas Superficiais. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, 2018.

CHIARELLO, Marilda et al. Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPLC-HRMS e sua relação com o uso e ocupação do solo. **Química Nova**, v. 40, n. 2, p. 158-165, 2017.

COELHO, Raul Candido da Trindade Paixão, BUFFON, Iuri.; GUERRA, Teresinha. Influência do uso e ocupação do solo na qualidade da água: um método para avaliar a importância da zona ripária. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 6, n. 1, p. 104-117, 2011.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO . **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Terceiro levantamento** - Safra 2019/20, v.5., 2019.

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

CUNHA, D.G.F.; DODDS, W.K.; DO CARMO CALIJURI, M. Defining nutrient and biochemical oxygen demand baselines for tropical rivers and streams in São Paulo State (Brazil): a comparison between reference and impacted sites. **Environmental Management**, v. 48, n. 5, p. 945, 2011.

DEHNERT, Gavin K. et al. Effects of low, subchronic exposure of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and commercial 2, 4-D formulations on early life stages of fathead minnows (Pimephales promelas). **Environmental toxicology and chemistry**, v. 37, n. 10, p. 2550-2559, 2018.

DEVARREWAERE, Wouter et al. Wind tunnel and CFD study of dust dispersion from pesticide-treated maize seed. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 128, p. 27-33, 2016.

Diniz V, Reyes GM, Rath S, Cunha DGF. Caffeine reduces the toxicity of albendazole and carbamazepine to the microalgae *Raphidocelis subcapitata* (Sphaeropleales, Chlorophyta). **Int Rev Hydrobiol**. 2020

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

FRIEDRICH, K. **Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2, 4D**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados, **Perfil Municipal**. Disponível em: <https://perfil.seade.gov.br/> Acesso em: 20 de maio de 2021.

GAFFNEY, Vanessa et al. Contaminantes emergentes-fármacos: monitorização, avaliação do risco ambiental e do risco para a saúde humana. **Águas & Resíduos**, v. 1, p. 15-27, 2016.

Gamble, D. S. Herbicide sorption by immersed soils: stoichiometry and the law of mass action in support of predictive kinetics. **Environmental Science & Technology**, 43(6), 1930–1934. 2009.

- GARBRECHT, Jurgen; MARTZ, Lawrence W. Digital elevation model issues in water resources modeling. **Hydrologic and hydraulic modeling support with geographic information systems**, p. 1-28, 2000.
- GARCÍA-CRUZ, U. et al. Inhibitory concentrations of 2,4D and its possible intermediates in sulfate reducing biofilms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1-3, p. 591-595, 15 jul. 2010.
- GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in life sciences**, v. 5, n. 6, p. 497-526, 2005.
- GOMES, Taciana F. et al. **Runoff, soil loss, and sources of particulate organic carbon delivered to streams by sugarcane and riparian areas: An isotopic approach**. Catena, v. 181, p. 104083, 2019.
- HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS J. **Handbook of Ecotoxicology**. Dordrecht, v. 2. London, UK: Blackwell Scientific Publications, 2003.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. Boletim 2019.
- INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2018. Disponível em: <http://www.dsr.inpe.br/laf/>.
- ISLAM, Faisal et al. Potential impact of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, p. 332-351, 2018.
- KILJANEK, Tomasz et al. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry—Honeybee poisoning incidents. **Journal of chromatography A**, v. 1435, p. 100-114, 2016.
- KÖPPEN, W. Climatología: con un estudio de los climas de la tierra. **Fondo de Cultura Económica**. México. 1948.
- LANGENBACH, Tomaz et al. Pesticide dispersion by spraying under tropical conditions. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 12, p. 843-849, 2017.
- LEBBORONI, M.; CHELAZZI, G.; BELLAVITA, M.; RICCHIARDINO, G. Potential use of anurans as indicators of biological quality in upstreams of central Italy. **Amphibia-Reptilia**, v. 27, n. 1, p. 73-79, 2006.
- LEONARD, R. A.; LANGDALE, G. W.; FLEMING, W. G. Herbicide runoff from upland piedmont watersheds – data and implications for modeling pesticide transport. **J. Environ. Qual.**, v. 8, p. 223-229, 1979.
- LEWIS, Stephen E. et al. Pesticide behavior, fate, and effects in the tropics: an overview of the current state of knowledge. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 20, p. 3917-3924, 2016.
- Li, C. C., Huo, S. L., Xi, B. D., Yu, Z. Q., Zeng, X. Y., Zhang, J. T., & Liu, H. L. Historical deposition behaviors of organochlorine pesticides (OCPs) in the sediments of a shallow eutrophic lake in eastern China: roles of the sources and sedimentological conditions. **Ecological Indicators**, 53, 1– 10, 2015.
- LIU, Shu-Shen et al. Combined toxicity of pesticide mixtures on green algae and photobacteria. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 95, p. 98-103, 2013.
- LORO, Vania Lucia et al. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894)(Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguay, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 569-578, 2015.

- MACKERETH, FIF., HERON, J. and TALLING, JF. Water analysis: some revised methods for limnologist. **London: Freshwater Biological Association.** 121 p., 1978.
- MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S.. **A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.** *Oecol. Bras.*, v.12, n.3, p.355-381, 2008.
- MANSANO, A. da S. **Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, isolados e em mistura sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico.** Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016
- MARKERT, B.A.; BREURE A.M.; ZECHMEISTER, H.G. Bioindicators & Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications. Trace Metals and other Contaminants in the Environment. v. 6. Ann Arbor, Michigan: **Elsevier Science**, 2003.
- MARTÍNEZ-RUIZ, E.B.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Exposure to the herbicide 2, 4-D produces different toxic effects in two different phytoplankton: A green microalga (*Ankistrodesmus falcatus*) and a toxicogenic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). **Science of The Total Environment**, v. 619, p. 1566-1578, 2018.
- Melo, D. C. **Efeitos de nanopartículas magnéticas sobre a microalga Raphidocelis subcapitata.** 2016. 153 f. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.
- MENEZES, João Paulo Cunha et al. **Relação entre padrões de uso e ocupação do solo e qualidade da água em uma bacia hidrográfica urbana.** Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 21, n. 3, p. 519-534, 2016.
- METCALFE, Chris D. et al. Pesticides related to land use in watersheds of the Great Lakes basin. **Science of the total environment**, v. 648, p. 681-692, 2019.
- MEYER-BARON, Monika et al. Meta-analysis on occupational exposure to pesticides—Neurobehavioral impact and dose-response relationships. **Environmental research**, v. 136, p. 234-245, 2015.
- MITCHELL, C.; BRODIE, J.; WHITE, I. Sediments, nutrients and pesticide residues in event flow conditions in streams of the Mackay Whitsunday Region, Australia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 1-4, p. 23-36, 2005.
- MONTAGNER, Cassiana C.; VIDAL, Cristiane; ACAYABA, Raphael D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.
- MOREIRA, Raquel Aparecida et al. Exposure to environmental concentrations of fipronil and 2, 4-D mixtures causes physiological, morphological and biochemical changes in *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111180, 2020.
- Nema, M., Hanson, M. L., & Müller, K. M. **Phylogeny of the egg-loving green alga Oophila amblystomatis (Chlamydomonadales) and its response to the herbicides atrazine and 2,4-D.** *Symbiosis* 2018.
- NEWMAN, M.C. **Fundamentals of ecotoxicology: the science of pollution.** 4rd. Ed. New York, 2014.
- NHIWATIWA, Tamuka; DALU, Tatenda; BRENTHONCK, Luc. Impact of irrigation based sugarcane cultivation on the Chiredzi and Runde Rivers quality, Zimbabwe. **Science of the Total Environment**, v. 587, p. 316-325, 2017.
- NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Arch fur. Hydrobiol.**, 14. 14 – 36. 1980.

Organization for Economic Cooperation & Development (OECD). **OECD guideline for testing of chemicals (Alga, Growth Inhibition Test)**, Paris, France, 2011.

OLIVEIRA, Livania Norberta; AQUINO, Cláudia Maria Sabóia. Índice da vegetação da diferença normalizada na sub-bacia hidrográfica do rio Gurguéia Piauí-Brasil: Análise do efeito da expansão agrícola. **Revista Geoaraguaia**, v. 10, n. 2, p. 126-143, 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). OPAS/BRAHEP/002/96. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília. 1996.

PFLEGER, Thomas et al. A short-term bioassay for whole plant toxicity. In: Plants for Toxicity Assessment: Second Volume. **ASTM International**, 1991.

PRADO, Raquel et al. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis. **Aquatic toxicology**, v. 102, n. 1-2, p. 10-17, 2011.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. FMC Corp., Princeton, New York, 1985.

REYNOLDS, A.; GILTRAP, Michelle; CHAMBERS, Gordon. Acute growth inhibition & toxicity analysis of nano-polystyrene spheres on *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 207, p. 111153, 2021.

RIOBOO, Ci et al. Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. **Aquatic toxicology**, v. 83, n. 4, p. 247-253, 2007.

SANCHEZ-BAYO, Francisco; HYNE, Ross V. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 577-586, 2011.

Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Schlenk, D. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. **Chemosphere** 55, 797–809, 2004.

SETZER, Alberto W.; MALINGREAU, Jean Paul. AVHRR monitoring of vegetation fires in the Tropics: Toward the development of a global product. **Biomass burning and global change**, v. 1, p. 25-39, 1996.

SHANKAR, M. V. et al. Fine route for an efficient removal of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) by zeolite-supported TiO2. **Chemosphere**, v. 63, n. 6, p. 1014-1021, 2006.

SIMPLÍCIO, Sharlle Ferrreira. **Características de crescimento e produção do feijão Caupi, sob aplicação de herbicidas**. 2015.

SINGH, P. K. Algicidal effect of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid on blue-green alga *Cylindrospermum* sp. **Archives of Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 69-72, 1974

SOARES, Alexandra Fátima Saraiva. **Uso de agrotóxicos, contaminação de mananciais e análise da legislação pertinente: um estudo na região de Manhuaçu-MG**. 2011.

SOARES, Alexandra Fátima Saraiva. **Contaminação das águas de abastecimento público por poluentes emergentes e o direito à saúde**. 2017.

SODRÉ, Fernando F. et al. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. **Química Nova**, 2010.

SOLÓRZANO, L. Determination of ammonia in natural waters by phenol hypochlorite method. **Limnol. Oceanogr**, 14:799–801, 1969.

Song, Y. **Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide**. J. Integr. Plant Biol. 56:106–113. 2014.

- STOPPELLI, I.M.B.S.; CRESTANA, S. Pesticide exposure and cancer among rural workers from Bariri, São Paulo State, Brazil. **Environment international**, v. 31, n. 5, p. 731-738, 2005.
- SPADOTTO, C. A. Influência das condições meteorológicas no transporte de agrotóxicos no ambiente. **Boletim SBMET**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 15-20, abr. 2006.
- TAYEB, W.; CHAIEB, I.; HAMMAMI, M. **Environmental fate and effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide**. Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards, p. 161-187, 2011.
- TEODORO, Valter Luiz lost et al. O conceito de bacia hidrográfica e a importância da caracterização morfométrica para o entendimento da dinâmica ambiental local. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 11, n. 1, p. 137-156, 2007.
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Nonpoint source pollution: The nation's largest water quality problem**. 1996.
- VEIGA, Marcelo Motta et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 2391-2399, 2006.
- VILLIOT, A. et al. Temporal and seasonal variation of atmospheric concentrations of currently used pesticides in Champagne in the centre of Reims from 2012 to 2015. **Atmospheric Environment**, v. 174, p. 82-91, 2018.
- VON SPERLING, Marcos. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. **Editora UFMG**, 1996.
- Weigelhofer, G., Fuchsberger, J., Teufl, B., Welti, N., & Hein, T. **Effects of riparian forest buffers on in-stream nutrient retention in agricultural catchments**. Journal of environmental quality, 2012.
- WONG, P. K. Effects of 2, 4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. **Chemosphere**, v. 41, n. 1-2, p. 177-182, 2000.
- WONG, P. K.; CHANG, L. The effects of 2, 4-D herbicide and organophosphorus insecticides on growth, photosynthesis, and chlorophyll a synthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* (mt+). **Environmental Pollution**, v. 55, n. 3, p. 179-189, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Health Topics – Pesticides**. Disponível em: <https://www.who.int/topics/pesticides/en/>
- ZAGATTO, Pedro Antônio; BERTOLETTI, Eduardo. Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações. **Ed Rima**, p. 1-13, 2006.
- ZEILHOFER, Peter et al. **SIG e regressão logística para mapeamento de risco de contaminação por pesticidas nos mananciais superficiais da bacia do Alto Rio das Mortes-MT**. In: Anais XIII, 2007
- Zhao, Z., Zhang, L., Wu, J., Fan, C. Distribution and bioaccumulation of organochlorine pesticides in surface sediments and benthic organisms from Taihu Lake, China. **Chemosphere** 77 (9), 1191–1198. 2009
- Zhu, X., Sun, Y., Zhang, X., Heng, H., Nan, H., Zhang, L., ... & Yang, Z. **Herbicides interfere with antigrazer defenses in *Scenedesmus obliquus***. Chemosphere, 2016.
- Zoratto, A. C. **Principais impactos da cana-de-açúcar**. II Fórum Ambiental de Alta Paulista, 2006.

## ANEXOS

**ANEXO A** – Concentração em nanograma por litro ( $\text{ng L}^{-1}$ ) dos compostos analisados em cada riacho nas coletas de fevereiro/2019

|                          | <b>Espraiado</b> | <b>Dagoberto</b> | <b>Sete Irmãos I</b> | <b>Sete Irmãos II</b> | <b>Mineirinho</b> | <b>Canchim</b> | <b>Campus 2</b> |
|--------------------------|------------------|------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| <b>Carbendazim</b>       | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | 5,2                   | 37,4              | <LQ            | <LQ             |
| <b>2-hidroxiatrazina</b> | <LQ              | <LQ              | 8,3                  | 17,0                  | 7,3               | <LQ            | 5,8             |
| <b>Cafeína</b>           | 56,9             | 12,3             | 9,4                  | 26,8                  | 77,8              | 18,5           | 33,5            |
| <b>Imidacloprido</b>     | <LQ              | 86,6             | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Simazina</b>          | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Ametrina</b>          | <LQ              | 1,3              | 1,1                  | 1,8                   | 1,0               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Carbofurano</b>       | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Hexazinona</b>        | <LQ              | >400             | 162,5                | 101,0                 | 81,4              | <LQ            | 90,8            |
| <b>Tebutiuron</b>        | <LQ              | 42,1             | 15,5                 | 6,8                   | 4,4               | <LQ            | 6,3             |
| <b>Atrazina</b>          | 5,3              | 0,0              | 19,4                 | 24,0                  | 17,9              | <LQ            | 5,8             |
| <b>Diuron</b>            | <LQ              | 21,6             | 5,0                  | 3,1                   | 7,8               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Clomazona</b>         | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Azoxistrobina</b>     | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Malation</b>          | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | 1,1                   | 3,6               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Tebuconazole</b>      | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>2,4-D</b>             | 47,0             | 14,8             | 193,2                | >400                  | 55,4              | 3,8            | 76,5            |
| <b>Fipronil</b>          | <LQ              | <LQ              | 0,9                  | 0,6                   | 5,5               | <LQ            | 0,2             |

**ANEXO B – Concentração em nanograma por litro ( $\text{ng L}^{-1}$ ) dos compostos analisados em cada riacho nas coletas de julho/2019**

|                          | <b>Espraiado</b> | <b>Dagoberto</b> | <b>Sete Irmãos I</b> | <b>Sete Irmãos II</b> | <b>Mineirinho</b> | <b>Canchim</b> | <b>Campus 2</b> |
|--------------------------|------------------|------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| <b>Carbendazim</b>       | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | 16,0              | <LQ            | 0,4             |
| <b>2-hidroxiatrazina</b> | <LQ              | 5,5              | 5,5                  | 11,5                  | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Cafeína</b>           | 88,5             | 14,3             | 13,2                 | 17,5                  | 78,5              | 42,0           | 47,6            |
| <b>Imidacloprido</b>     | <LQ              | 68,0             | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Simazina</b>          | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Ametrina</b>          | 4,0              | 0,3              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Carbofurano</b>       | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Hexazinona</b>        | <LQ              | 298,0            | 10,2                 | 5,6                   | <LQ               | <LQ            | 1,8             |
| <b>Tebutiuron</b>        | <LQ              | 49,6             | 15,7                 | 5,9                   | 4,0               | <LQ            | 5,5             |
| <b>Atrazina</b>          | <LQ              | 1,8              | 10,8                 | 3,2                   | <LQ               | 4,9            | <LQ             |
| <b>Diuron</b>            | <LQ              | 23,9             | <LQ                  | <LQ                   | 2,4               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Clomazona</b>         | 1,4              | 0,4              | 0,3                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Azoxistrobina</b>     | 2,1              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Malation</b>          | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Tebuconazole</b>      | 1,3              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>2,4-D</b>             | 14,5             | 27,7             | 4,5                  | 1,9                   | <LQ               | 18,7           | 3,8             |
| <b>Fipronil</b>          | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | 3,3               | <LQ            | <LQ             |

**ANEXO C – Concentração em nanograma por litro ( $\text{ng L}^{-1}$ ) dos compostos analisados em cada riacho nas coletas de janeiro/2020**

|                          | <b>Espraiado</b> | <b>Dagoberto</b> | <b>Sete Irmãos I</b> | <b>Sete Irmãos II</b> | <b>Mineirinho</b> | <b>Canchim</b> | <b>Campus 2</b> |
|--------------------------|------------------|------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| <b>Carbendazim</b>       | <LQ              | <LQ              | 2,0                  | 3,5                   | 14,3              | <LQ            | <LQ             |
| <b>2-hidroxiatrazina</b> | <LQ              | 7,0              | 5,0                  | 5,9                   | <LQ               | 0,3            | 2,8             |
| <b>DIA</b>               | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Imidacloprido</b>     | <LQ              | 68,3             | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>DEA</b>               | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Simazina</b>          | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Carbofurano</b>       | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | 26,0              | <LQ            | <LQ             |
| <b>Hexazinona</b>        | <LQ              | 92,1             | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Tebutiuron</b>        | <LQ              | 49,3             | 9,4                  | 7,4                   | 4,7               | 0,3            | 4,8             |
| <b>Atrazina</b>          | <LQ              | <LQ              | 3,2                  | 3,3                   | <LQ               | <LQ            | 2,4             |
| <b>Diuron</b>            | <LQ              | 18,9             | 1,3                  | 2,7                   | 2,0               | <LQ            | 0,4             |
| <b>Clomazona</b>         | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Azoxistrobina</b>     | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Malation</b>          | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>Tebuconazole</b>      | <LQ              | <LQ              | <LQ                  | <LQ                   | <LQ               | <LQ            | <LQ             |
| <b>2,4-D</b>             | 267,1            | 40,3             | 39,5                 | 21,4                  | 36,0              | 220,5          | 17,8            |
| <b>Fipronil</b>          | <LQ              | <LQ              | 0,6                  | 1,2                   | 21,9              | <LQ            | <LQ             |

**ANEXO D** – Teste post-hoc de Tukey para verificar diferença significativa (p<0,05) entre as concentrações de 2,4-D nas amostras analisadas e o controle.

| -        | 100mg/L | 50mg/L | 5mg/L | 500 µg/L | 100 µg/L | 5 µg/L | 500 ng/L | Controle |
|----------|---------|--------|-------|----------|----------|--------|----------|----------|
| 100mg/L  | -       | 1,000  | 0,000 | 0,000    | 0,000    | 0,000  | 0,000    | 0,000    |
| 50mg/L   | 1,000   | -      | 0,017 | 0,003    | 0,000    | 0,015  | 0,000    | 0,000    |
| 5mg/L    | 0,000   | 0,017  | -     | 1,000    | 1,000    | 1,000  | 1,000    | 1,000    |
| 500 µg/L | 0,000   | 0,003  | 1,000 | -        | 1,000    | 1,000  | 1,000    | 1,000    |
| 100 µg/L | 0,000   | 0,000  | 1,000 | 1,000    | -        | 1,000  | 1,000    | 1,000    |
| 5 µg/L   | 0,000   | 0,015  | 1,000 | 1,000    | 1,000    | -      | 1,000    | 1,000    |
| 500 ng/L | 0,000   | 0,000  | 1,000 | 1,000    | 1,000    | 1,000  | -        | 1,000    |
| Controle | 0,000   | 0,000  | 1,000 | 1,000    | 1,000    | 1,000  | 1,000    | -        |