

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Contaminação de águas de pesque-pague por
agrotóxicos e cafeína em áreas de cultivo de
cana-de-açúcar**

Maria Amália da Silva Santarossa

Jaboticabal, São Paulo
2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Contaminação de águas de pesque-pague por
agrotóxicos e cafeína em áreas de cultivo de
cana-de-açúcar**

Maria Amália da Silva Santarossa

Orientador: Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo
2017

Santarossa, Maria Amália da Silva
S499c Contaminação de águas de pesque-pague por agrotóxicos e
cafeína em áreas de cultivo de cana-de-açúcar / Maria Amália da Silva
Santarossa. -- Jaboticabal, 2017
xvii, 122 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aqüicultura, 2017

Orientador: Joaquim Gonçalves Machado Neto

Banca examinadora: José Roberto Ferreira, Marco Antônio de
Andrade Belo, Regina Tereza Rosim Monteiro, Teresa Cristina Tarlé
Pissara

Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Pesque-pague. 3. Herbicidas. 4. Cafeína. 5.
Organismos bioindicadores. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de
Aqüicultura.

CDU 639.3:556.55

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação -
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

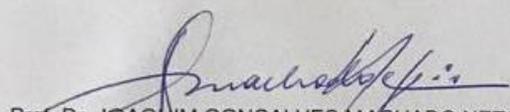
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

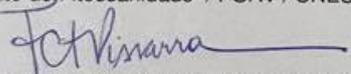
TÍTULO: Contaminação de águas de pesque-pague por agrotóxicos e cafeína em áreas de cultivo de cana-de-açúcar

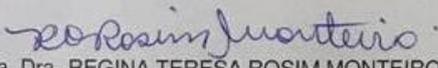
AUTORA: MARIA AMÁLIA DA SILVA SANTAROSSA

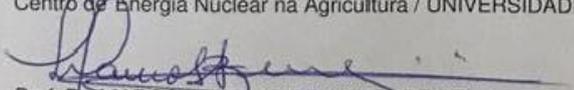
ORIENTADOR: JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO

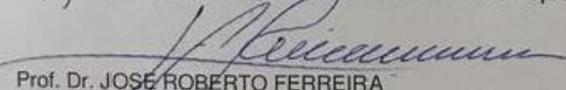
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAQUIM GONÇALVES MACHADO NETO
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. TERESA CRISTINA TARLE PISSARRA
Departamento de Engenharia Rural / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO


Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. JOSE ROBERTO FERREIRA
Departamento de Química Analítica / USP, Piracicaba-SP

Jaboticabal, 20 de março de 2017.

Sumário

Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Apoio Financeiro	7
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas	11
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1. A cultura de cana-de-açúcar e a utilização de agrotóxicos	18
3.2. Contaminação da rede fluvial com agrotóxicos utilizados em culturas de cana-de-açúcar	19
3.3. Influência do sedimento de fundo na contaminação das águas por agrotóxicos.....	22
3.4. Contaminação da rede de drenagem por cafeína	25
3.5. Ensaio ecotoxicológico para o monitoramento da qualidade da água	27
3.5.1. Organismos indicadores da contaminação ambiental	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Área de estudo.....	35
4.2. Modelo digital de elevação da área de estudo – MDE	37
4.3. Procedimento de amostragem das águas e sedimento	43
4.4. Propriedades físicas e químicas do sedimento de fundo dos tanques de peixes.....	45
4.5. Quantificação dos resíduos de agrotóxicos e cafeína.....	46
4.6. Quantificação de cátions	52
4.7. Quantificação de ânions	54
4.8. Ensaio ecotoxicológico das águas coletadas dos pesque-pague para os organismos	
bioindicadores <i>Daphnia magna</i> e <i>Lemna minor</i>	55
4.8.1. <i>Daphnia magna</i>	56
4.8.2. <i>Lemna minor</i>	57
4.9. Toxicidade do tebutiuron e da cafeína para os organismos <i>Daphnia magna</i> , <i>Lemna minor</i>	
e <i>Oreochromis niloticus</i>	59
4.9.1. Classificação do tebutiuron e cafeína quanto à toxicidade aguda.....	62
4.9.2. Risco de intoxicação ambiental do herbicida tebutiuron para os organismos	
<i>Daphnia magna</i> , <i>Lemna minor</i> e <i>Oreochromis niloticus</i>	63
4.10. Análise Estatística.....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1. Contaminação das amostras de água por agrotóxicos nos pesque-pague	66

5.2.	Influência dos períodos de estiagem e de chuvas na contaminação das águas dos pesque-pague por agrotóxicos	71
5.3.	Comparação da contaminação das águas de afluentes e de tanques de peixes dos pesque-pague por agrotóxicos.	72
5.4.	Contaminação dos sedimentos de fundo dos tanques dos pesque-pague por agrotóxicos	76
5.5.	Contaminação das águas de afluentes e de tanques de peixes por cafeína	81
5.6.	Toxicidade aguda das águas dos pesque-pague para organismos aquáticos	84
5.6.1.	<i>Daphnia magna</i>	84
5.6.2.	<i>Lemna minor</i>	87
5.7.	Toxicidade aguda dos contaminantes prevalentes das amostras de água dos pesque-pague para os organismos aquáticos <i>Daphnia magna</i> , <i>Lemna minor</i> e <i>Oreochromis niloticus</i>	95
5.7.1.	Ensaio de sensibilidade com a substância de referência KCl para <i>O. niloticus</i>	95
5.7.2.	Toxicidade do tebutiuron e cafeína para <i>Daphnia magna</i> , <i>Lemna minor</i> e <i>Oreochromis niloticus</i>	96
5.7.3.	Risco ambiental do herbicida tebutiuron para os organismos <i>Daphnia magna</i> , <i>Lemna minor</i> e <i>Oreochromis niloticus</i>	100
5.8.	Considerações gerais sobre o uso e os efeitos dos agrotóxicos	102
6.	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS.....	108

Dedicatória

À Deus por mais uma conquista alcançada!

Dedico aos meus pais

Paulo Roberto da Silva e Cinira Aparecida Camolezi da Silva, por todo carinho, amor, apoio e incentivo.

*À meu esposo Rafael Zolla Santarossa, pela
companheirismo, amor, compreensão, apoio e torcida.*

Amo muito vocês!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, pela orientação, disposição, confiança e ensinamentos compartilhados que sempre agregaram conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), pela oportunidade oferecida e ensinamentos adquiridos.

Aos funcionários do CAUNESP que sempre estiveram dispostos a ajudar no que fosse necessário.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Domingues Velini pelos ensinamentos e pela disponibilidade de uso do laboratório NUPAM, UNESP/Botucatu para a realização das análises cromatográficas.

Ao Químico José Roberto Marques Silva, da UNESP/Botucatu, pelo fundamental trabalho nas análises cromatográficas.

À Prof. Dra. Teresa Cristina Tarlé Pissara, aos funcionários Izilda Maria Carvalho Máximo e Ronaldo José de Barros e a doutoranda Renata Cristina Araújo Costa, pela amizade, ensinamentos e auxílios oferecidos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Ferreira pelo fornecimento de materiais de apoio importantes para a escrita da tese.

Aos meus irmãos Marcelo Ap. da Silva e Margareth da Silva Benevides por toda a amizade, carinho, auxílios e palavras de apoio.

Aos meus sogros José Ademir Santarossa e Rosane Zolla Santarossa e ao meu cunhado Daniel Santarossa pela torcida para mais uma conquista em minha vida.

Às amigas do LABORSEG, Nicoli Paganoti de Mello, Ana Carla Coleone, Angela Aparecida Machado, Naiara Fernanda Ignácio, Manuela de Oliveira Marinho e Juliana Pinê Américo pela amizade, pelo auxílio na realização dos experimentos da tese, conhecimentos compartilhados e bons momentos vividos;

À funcionária Marcia Regina Macri Ferreira por todo carinho, amizade e auxílio oferecido.

Aos funcionários da FCAV, em especial ao Gilson e Jurandir, pela ajuda nos experimentos de campo.

Aos membros da banca de defesa do doutorado pela disponibilidade.

Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma auxiliaram nessa importante fase da minha vida.

Muito Obrigada!

Apoio Financeiro

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

*“Ter desafios é o que faz a vida interessante e superá-los é o
que faz a vida ter sentido”.*
(Joshua J. Marine)

Lista de Figuras

Figura 1. Porcentagem de área plantada com a cultura cana-de-açúcar nas regiões do Brasil (A) e dos Estados da região Sudeste (B) para o ano de 2015 (UNICA, 2015).....	18
Figura 2. Representação dos processos de sorção, transformação e transporte que ocorrem com a molécula de agrotóxicos ao ser introduzido no ambiente (Steffen et al., 2011).....	20
Figura 3. Rotas de transporte de cafeína a partir do seu descarte em sistema de esgoto sanitário. Fonte: Canela et al. (2014).	26
Figura 4. Macrófita aquática <i>L. minor</i> , vulgarmente conhecida como lentilha d'água.....	31
Figura 5. Exemplar do microcrustáceo <i>D. magna</i> adulto (A) e neonato (B).	33
Figura 6. Exemplar de Tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>).....	34
Figura 7. Localização dos pesque-pague na região do Estado de São Paulo (A) e Localização da Bacia do Mogi Guaçu e do Tietê/Batalha (B). Fonte: Google Earth (2016) e Diagnóstico da Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu – “Relatório Zero”, 1999.	35
Figura 8. Simulação do fluxo de água (A) e Modelo digital de elevação (MDE) (B) para a microbacia em que se insere o pesque-pague A.....	38
Figura 9. Simulação do fluxo de água (A) e Modelo digital de elevação (MDE) (B) para a microbacia em que se insere o pesque-pague B.....	39
Figura 10. Simulação do fluxo de água (A) e Modelo digital de elevação (MDE) (B) para a microbacia em que se insere o pesque-pague C.	40
Figura 11. Simulação do fluxo de água (A) e Modelo digital de elevação (MDE) (B) para a microbacia em que se insere o pesque-pague D.	41
Figura 12. Simulação do fluxo de água (A) e Modelo digital de elevação (MDE) (B) para a microbacia em que se insere o pesque-pague E.....	42
Figura 13. Balde de polipropileno (A) e frascos de plásticos revestidos com papel alumínio (B) utilizados nas coletas de água dos afluentes e tanques de criação de peixes dos empreendimentos aquícolas avaliados.....	44
Figura 14. Procedimento de coleta e armazenagem do sedimento de fundo dos tanques de peixes dos empreendimentos aquícolas avaliados.	45
Figura 15. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu, modelo Proeminence UFLC (A) e espectrômetro de massas 3200 Q TRAP Applied Biosystems (B).	47
Figura 16. Processos físicos, químicos e microbiológicos que ocorrem com os agrotóxicos quando inseridos nas águas superficiais. Fonte: Holvoet et al. (2007).	76
Figura 17. Estruturas moleculares dos herbicidas detectados nas amostras de sedimento de fundo dos pesque-pague avaliados.	79
Figura 18. Imagem representativa da altimetria do terreno (A) e modelo digital de elevação (MDE) (B) entre a Estação Tratamento de Esgoto, na cota 545 e o pesque-pague A, na cota 525, às margens do Córrego Jaboticabal, SP.	83
Figura 19. Carta controle do organismo <i>D. magna</i> para a substância de referência NaCl. Médias da CE_{50-48h} e limites superior e inferior.	85
Figura 20. Carta controle do organismo <i>L. minor</i> para a substância de referência NaCl. Médias da CI_{50-7d} e limites superior e inferior.....	87
Figura 21. Porcentagem de inibição de crescimento de <i>L. minor</i> no sétimo dia de exposição a concentrações crescentes de água de afluente (A) e de tanque (B) dos pesque-pague. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.	89
Figura 22. Valores de condutividade elétrica ($\mu S\ cm^{-1}$), para o sétimo dia do teste de toxicidade aguda com <i>L. minor</i> , das águas de afluente (AA) e de tanque (AT)	

coletadas entre o período de Junho/2014 a Maio/2015 nos cinco pesque-pague avaliados.....	92
Figura 23. Valores de pH, para o sétimo dia do teste de toxicidade aguda com <i>L. minor</i> , das águas de afluente (AA) e de tanque (AT) coletadas entre o período de Junho/2014 a Maio/2015 nos cinco pesque-pague avaliados.....	94
Figura 24. Carta controle do organismo <i>O. niloticus</i> para a substância de referência KCl. Médias da CL _{50-48h} e limites superior e inferior.....	96
Figura 25. Diminuição do número de frondes de <i>L. minor</i> nos testes de toxicidade, após sete dias de exposição ao herbicida tebutiuron.....	97
Figura 26. Porcentagem de imobilidade/mortalidade para <i>D. magna</i> em concentrações crescentes de tebutiuron e cafeína.	98
Figura 27. Porcentagem de inibição de crescimento para <i>L. minor</i> em concentrações crescentes de tebutiuron e cafeína.	98
Figura 28. Porcentagem de mortalidade para <i>O. niloticus</i> em concentrações crescentes de tebutiuron e cafeína.....	98

Lista de Tabelas

Tabela 1. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas aplicados em cultura de cana-de-açúcar para organismos aquáticos bioindicadores da contaminação ambiental.	30
Tabela 2. Dados da localização dos pesque-pague estudados.	36
Tabela 3. Análise química, granulométrica e de fertilidade do sedimento de fundo do tanque de peixes na profundidade de 0,0 a 10,0 cm.	46
Tabela 4. Relação de produtos analisados nas amostras de água e de sedimento de fundo dos empreendimentos avaliados.	48
Tabela 5. Limites de detecção (ng mL^{-1}) e de quantificação (ng mL^{-1}), equações de linearidade e coeficiente de determinação (R^2), gerados após análise das soluções padrões dos agrotóxicos e da cafeína para as águas coletadas.	49
Tabela 6. Limites de detecção (ng mL^{-1}) e de quantificação (ng mL^{-1}), equações de linearidade e coeficiente de determinação (R^2), gerados após análise das soluções padrões dos agrotóxicos e da cafeína para o sedimento de fundo.	50
Tabela 7. Porcentagem de recuperação dos agrotóxicos para a concentração de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ e seus respectivos desvios padrões.	51
Tabela 8. Tempo de retenção (minutos), massa molecular dos analitos (g mol^{-1}) e íons secundários (fragmentos) gerados.	52
Tabela 9. Parâmetros e condições do Espectrômetro de Absorção Atômica em Chamas para análises dos cátions nas águas de afluente e de tanque coletadas dos pesque-pague.	53
Tabela 10. Coeficiente de determinação (R^2) gerado após análise das soluções padrões dos cátions avaliados nas amostras de água coletadas.	54
Tabela 11. Limites de detecção (mg L^{-1}) e quantificação (mg L^{-1}), equação de linearidade e coeficiente de determinação gerado após análise das soluções padrões dos ânions.	55
Tabela 12. Classes de toxicidade aguda proposta por Zucker (1985) e Sistema de Classificação quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental (IBAMA, 2015) dos contaminantes prevalentes para <i>D. magna</i> , <i>L. minor</i> e <i>O. niloticus</i>	63
Tabela 13. Classificação dos valores de quociente de risco (QR) para organismos aquáticos de acordo com os procedimentos estabelecidos por Goktepe et al. (2004).	64
Tabela 14. Valores totais das concentrações (ng mL^{-1} ou ppb) dos herbicidas detectados nas águas de afluente (AA) e de tanque de peixes (AT) para os cinco pesque-pague, nos quatro períodos de amostragens, compreendidos entre Maio/2014 e Junho/2015.	67
Tabela 15. Valores das concentrações (ng mL^{-1}) dos herbicidas detectados nas águas coletadas e as precipitações (mm), durante o período de amostragem de Junho/2014 a Maio/2015, agrupados em épocas de estiagem e de chuvas.	71
Tabela 16. Valores das concentrações dos herbicidas (ng mL^{-1}) nas águas de afluente (AA) e de tanque (AT) para os cinco pesque-pague, no período entre Junho/2014 a Maio/2015.	73
Tabela 17. Porcentagens da declividade média da microbacia em que se inserem os pesque-pague, da mata ciliar ao redor do curso do rio que os abastecem, da área de plantação de cana-de-açúcar e da contaminação de suas águas pelos herbicidas.	74
Tabela 18. Concentrações (ng g^{-1}) dos agrotóxicos encontrados nas amostras de sedimento de fundo dos tanques de peixes para os cinco pesque-pague avaliados no período entre Junho/2014 a Maio/2015.	77
Tabela 19. Valores totais de cafeína (ng mL^{-1}) encontrados nas águas de afluente e tanque de peixes dos cinco pesque-pague avaliados.	81

Tabela 20. Valores de CE_{50-48h} ($mg L^{-1}$) para os herbicidas tebutiuron, hexazinona, metolacoloro, atrazina, ametrina e clomazone para cladóceros e suas classificações toxicológicas de acordo com Zucker (1985).	86
Tabela 21. Valores de Cl_{50-7d} para os herbicidas tebutiuron, hexazinona, metolacoloro, atrazina, ametrina e clomazone para macrófitas aquáticas e suas classificações toxicológicas de acordo com Zucker (1985).	90
Tabela 22. Coeficientes de correlação entre as variáveis % de inibição de crescimento de <i>L. minor</i> e condutividade elétrica no sétimo dia de experimentação com os efluentes coletados entre o período de Junho/2014 a Maio/2015 nos cinco pesque-pague.	91
Tabela 23. Valores totais ($\mu g mL^{-1}$) de cátions e ânions nas águas de afluente e de tanque de peixes dos cinco pesque-pague e na solução de meio de cultivo do organismo <i>L. minor</i>	93
Tabela 24. Coeficientes de correlação entre as variáveis % de inibição de crescimento das frondes de <i>L. minor</i> e pH, para o sétimo dia de experimentação com os efluentes coletados entre o período de Junho/2014 a Maio/2015 nos cinco pesque-pague avaliados.	95
Tabela 25. Valores de Quociente de Risco (QR) e suas respectivas classificações de risco do herbicida tebutiuron para os organismos <i>D. magna</i> , <i>L. minor</i> e <i>O. niloticus</i> na profundidade de 0,30 m.	101
Tabela 26. Valores de Quociente de Risco (QR) e suas respectivas classificações de risco do herbicida tebutiuron para os organismos <i>D. magna</i> , <i>L. minor</i> e <i>O. niloticus</i> na profundidade de 2,0 m.	101
Tabela 27. Valores de Quociente de Risco (QR) e suas respectivas classificações de risco do herbicida tebutiuron para os organismos <i>D. magna</i> , <i>L. minor</i> e <i>O. niloticus</i> na profundidade de 3,0 m.	102

RESUMO

Com esse estudo objetivou-se avaliar a qualidade das águas de pesque-pague quanto a presença de agrotóxicos e cafeína, determinar a toxicidade dessas águas para *Daphnia magna* e *Lemna minor* e avaliar o risco ambiental dos contaminantes prevalentes para *D. magna*, *L. minor* e *Oreochromis niloticus*. Para tanto, amostras de águas e de sedimentos de fundo dos tanques de peixes dos pesque-pague foram coletadas trimestralmente entre Junho/2014 e Maio/2015. As determinações dos resíduos de agrotóxicos e de cafeína foram realizadas por LC-MS/MS. As maiores contaminações das águas ocorreram, em ordem decrescente, com a cafeína e com os herbicidas tebutiuron, metolacoloro, hexazinona, atrazina, ametrina e clomazone. Os fatores que mais influenciaram a contaminação das águas por agrotóxicos foram as características físicas e químicas dos herbicidas, quantidade de área cultivada com cana-de-açúcar no entorno dos pesque-pague e a coincidência ente as maiores precipitações pluviais e as aplicações dos agrotóxicos. Os lançamentos de efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto em águas superficiais que margeiam os pesque-pague foi o fator responsável pela contaminação das águas com a cafeína. As águas dos pesque-pague não apresentaram toxicidade para *D. magna* e *L. minor* e a baixa concentração de nutrientes nessas águas foi um fator relevante para a inibição de crescimento de *L. minor*. O tebutiuron é o agrotóxico prevalente nas águas dos pesque-pague e é mais tóxico para os organismos-teste que a cafeína. Pela toxicidade aguda, o tebutiuron se classifica como de alto risco de intoxicação ambiental para *L. minor* e um risco de intoxicação ambiental aceitável para *D. magna* e *O. niloticus*.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, pesque-pague, herbicidas, cafeína, organismos bioindicadores.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the quality of fee-fishing ponds water about the pesticides and caffeine presence, to determine the water toxicity for *Daphnia magna* and *Lemna minor*, and to evaluate the environmental risk of contaminants prevalent for *D. magna*, *L. minor* and *Oreochromis niloticus*. For that, water and bottom sediments samples from the fish tanks of the fee-fishing ponds, were collected quarterly between June/2014 and May/2015. Residues determinations of pesticides and caffeine were performed by LC-MS/MS. The highest water contamination occurred, in descending order, with caffeine and the herbicides tebutiuron, metolachlor, hexazinone, atrazine, ametrine and clomazone. The factors that most influenced the water contamination by pesticides were the physical and chemical characteristics of the herbicides, the amount of area cultivated with sugarcane in the surroundings of the fee-fishing ponds and the coincidence between the greater precipitations and the pesticides applications. The effluent releases of Sewage Treatment Stations in surface water that border the fee-fishing ponds was the responsible factor for the contamination of the water by caffeine. The water of the fee-fishing ponds had no toxicity for *D. magna* and *L. minor* and the low concentration of nutrients in the water was a relevant factor for the inhibition of *L. minor* growth. Tebutiuron is the prevalent agrochemical in fee-fishing ponds water and it is more toxic to test organisms than caffeine. Due to acute toxicity, tebutiuron is classified as a high environmental intoxication risk for *L. minor* and a acceptable environmental intoxication risk for *D. magna* and *O. niloticus*.

Key-words: sugarcane, fee-fishing ponds, herbicides, caffeine, bioindicator organisms.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional ocorrido nas últimas décadas, em decorrência dos avanços na saúde e nas melhorias de condições de vida, associado a crescente demanda por alimentos, têm proporcionado grandes transformações no meio agrícola. Dentre essas, a dependência de insumos, principalmente produtos fitossanitários, como os agrotóxicos.

O uso dos agrotóxicos tem provocado uma série de perturbações e transformações negativas no ambiente, principalmente nas redes hidrográficas; que são os receptores finais das substâncias produzidas e liberadas no ambiente. Um empreendimento diretamente dependente das redes hidrográficas é o pesque-pague. Nos pesque-pague se praticam uma modalidade de pesca esportiva, ou *hobby*, denominada também de pesca de lazer ou pesca amadora.

Na região Sudeste do Brasil, a maioria dos pesque-pague se insere em áreas de intenso cultivo de cana-de-açúcar, onde predomina o controle químico das plantas daninhas com os herbicidas. O uso intenso de herbicida na cultura de cana-de-açúcar pode resultar em contaminações das águas dos pesque-pague, principalmente na estação das chuvas.

Nas águas dos pesque-pague ligados às redes hidrográficas que passam dentro ou nas proximidades de áreas urbanas também podem se esperar contaminações com substâncias emergentes, como a cafeína.

A cafeína é uma substância indicadora da contaminação das águas com esgotos domésticos, inclusive por efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) das cidades. Mesmo que os níveis de cafeína presentes no ambiente aquático não apresentem risco a saúde humana e animal, essa substância é indicadora da presença de outros contaminantes de origem urbana que causam muitos efeitos indesejáveis para os seres vivos.

Diante da possibilidade da presença de contaminantes tóxicos nas águas dos pesque-pague e de efeitos nos organismos da biota dos ecossistemas aquáticos, estudos ecotoxicológicos têm sido utilizados em análises ambientais, e

em etapas que envolvem todos os processos e as transformações químicas dos compostos tóxicos no ambiente.

Por meio de estudos ecotoxicológicos se podem determinar o grau de toxicidade de diversos corpos hídricos contaminados com os compostos tóxicos específicos e a capacidade dos agentes tóxicos em produzir efeitos deletérios aos organismos vivos expostos. Os resultados dos estudos ecotoxicológicos são utilizados como referência para a gestão ambiental dos impactos antrópicos nos ambientes.

Para a gestão ambiental da qualidade das águas dos pesque-pague, a avaliação quantitativa da contaminação das águas de afluente e dos tanques de pesca por contaminantes tóxicos de origem agrícola e urbana é fundamental para se determinar riscos de intoxicação da biota aquática e da população humana usuária das águas, e para se recomendar e implementar ações mitigadoras.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a contaminação por agrotóxicos e cafeína em águas de pesque-pague inseridos em microbacias cultivadas com cana-de-açúcar, nas regiões administrativas de Ribeirão Preto e Central, no Estado de São Paulo¹.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a contaminação das águas de afluente e de tanques de peixes de pesque-pague com agrotóxicos, usados na cultura de cana-de-açúcar, e com a cafeína.

Relacionar a contaminação de agrotóxicos e cafeína nas águas de pesque-pague com as características climáticas e com o relevo das microbacias.

Relacionar a presença dos agrotóxicos nas águas de pesque-pague com a contaminação dos sedimentos de fundo dos tanques de peixes.

Avaliar a toxicidade das águas dos pesque-pague e dos parâmetros físicos e químicos das águas para *L. minor* e *D. magna*.

Avaliar a toxicidade dos dois contaminantes mais concentrados nas águas dos pesque-pague para *D. magna*, *L. minor* e *O. niloticus* e classificá-los pela toxicidade aguda e pelo risco de intoxicação ambiental dos organismos-teste.

¹ Regiões Administrativas do Estado de São Paulo. Fonte: <http://www.cidadespaulistas.com.br/prt/cnt/mp-reg-adm.htm> (acesso em 03.09.2016)

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A cultura de cana-de-açúcar e a utilização de agrotóxicos

A cana-de-açúcar foi introduzida no período colonial no país e se transformou em uma das principais culturas comerciais da economia brasileira (MAPA, 2015). O cultivo de cana-de-açúcar no ano de 2015 se concentrou na região Centro-Sul do Brasil, com destaque para a região Sudeste. Nesta, 64,0% da área plantada foi cultivada com cana-de-açúcar, e 82,0% desse cultivo concentraram-se no Estado de São Paulo (Figura 1A e B) (UNICA, 2015).

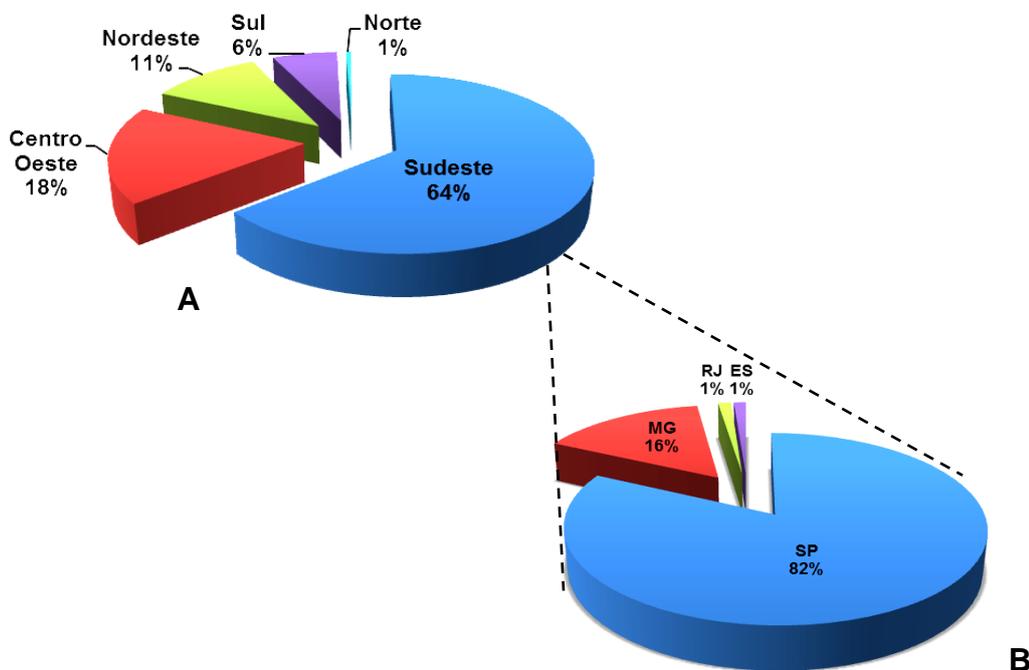


Figura 1. Porcentagem de área plantada com a cultura cana-de-açúcar nas regiões do Brasil (A) e dos Estados da região Sudeste (B) para o ano de 2015 (UNICA, 2015).

Na safra de 2014/2015 foram cultivados 5.728.285,0 hectares com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo (UNICA, 2015). A produção de cana-de-açúcar nessa safra foi de 634.767.000,0 toneladas e a produtividade média de 70.495,0 kg/ha (CONAB, 2015).

Estimava-se um aumento de produção média de cana-de-açúcar de 3,2% até a safra de 2018/19 (MAPA, 2015), devido ao uso intensivo de tecnologias modernas de produção, com destaque para a utilização de agrotóxicos. De

acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Afluente (MAPA), estão registradas para aplicação na cultura de cana-de-açúcar 276 formulações comerciais de herbicidas e 73 de inseticidas (AGROFIT, 2015).

Na safra de 2014/2015, foram destinadas para a cultura de cana-de-açúcar 72.913,0 toneladas de agrotóxicos, compostas por 82,2% de herbicidas, 13,2% de inseticidas, 1,90% de fungicida e 0,01% de acaricidas (SINDIVEG, 2016).

3.2. Contaminação da rede fluvial com agrotóxicos utilizados em culturas de cana-de-açúcar

Os ecossistemas aquáticos recebem inúmeros poluentes orgânicos e inorgânicos provenientes do aumento das atividades antropogênicas, e a contaminação das águas tem atingido proporções alarmantes (Arias et al., 2007).

A expansão das atividades agrícolas acompanhada pelo uso intensivo de agrotóxicos tem propiciado efeitos adversos ao ambiente. Portanto, a preocupação com a contaminação das águas pelos agrotóxicos tem aumentado na mesma proporção do aumento de suas vendas e de uso nas lavouras (Armas et al., 2005; Marques et al., 2007; Grützmacher et al., 2008).

O destino dos agrotóxicos no ambiente é governado por processos de sorção (adsorção, absorção e dessorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (volatilização, lixiviação e carreamento superficial) (Figura 2). Além desses processos, as condições meteorológicas, localização da área no relevo, a presença e a ausência de plantas e práticas de manejo agrícola também podem afetar o destino dos agrotóxicos no ambiente (Spadotto, 2006a).

Após as aplicações nas áreas agrícolas, os agrotóxicos podem ser retidos pelos coloides do solo ou permanecerem em solução. O processo de retenção representa um fator preponderante na disponibilidade desses compostos químicos, que retarda ou acelera o movimento dos produtos em diferentes direções no solo (Harper, 1994; Spadotto, 2006b).

Na solução do solo, os agrotóxicos podem sofrer transformações de natureza química, física ou biológica, e serem transportados para outros compartimentos ambientais (Harper, 1994; Spadotto, 2006b).

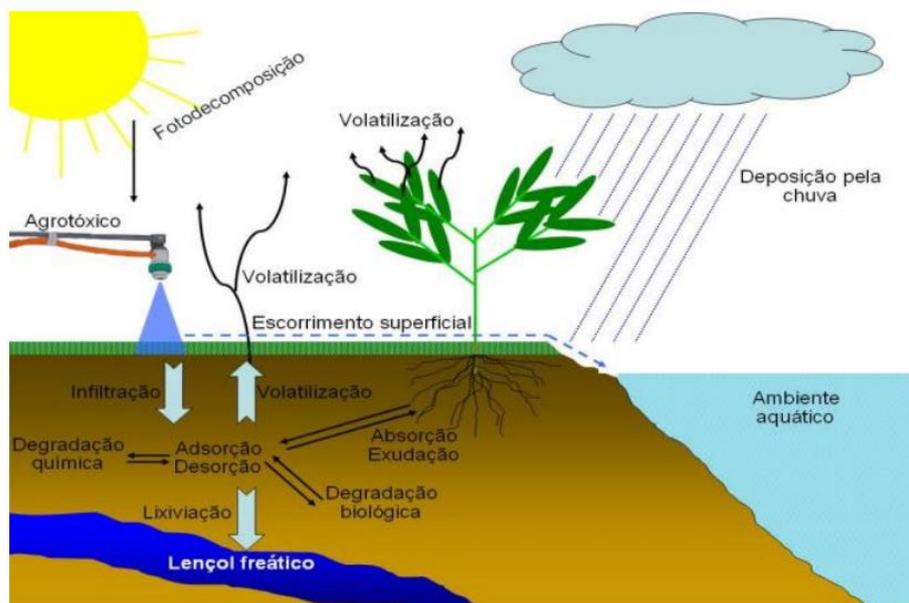


Figura 2. Representação dos processos de sorção, transformação e transporte que ocorrem com a molécula de agrotóxicos ao ser introduzido no ambiente (Steffen et al., 2011).

Dentre os processos de transporte dos agrotóxicos nos compartimentos ambientais, a lixiviação e o carreamento superficial merecem destaque. O carreamento superficial resulta na contaminação das águas superficiais, com os agrotóxicos adsorvidos às partículas do solo erodido, ou em solução na água de escoamento. As águas subterrâneas, as quais alimentam os aquíferos, são contaminadas por substâncias químicas por lixiviação (Spadotto et al., 2004).

Nas aplicações dos agrotóxicos nas lavouras, em alguns casos, menos de 0,1% atingem os organismos-alvo de controle e 99,9% do total aplicado fica disponível no ambiente e podem ser transportados para outros compartimentos ambientais. Os processos de transportes, causam perdas de 2,0 a 90,0% dos agrotóxicos aplicados nas lavouras (Spadotto, 2006b; Ribeiro et al., 2007; Santos, 2013).

Nos diversos compartimentos ambientais, os agrotóxicos atingem e intoxicam os organismos vivos dos diversos nichos e causam desequilíbrios ecológicos. Portanto, são classificados de contaminantes aquáticos de nível

grave, uma vez que podem atingir de modo letal espécies não-alvos do controle químico (Grisolia, 2005; Arias et al., 2007).

Diversos estudos realizados no país constataram contaminações ambientais com agrotóxicos. As águas superficiais e das chuvas estavam contaminadas com agrotóxicos aplicados em culturas agrícolas próximas aos municípios de Lucas do Rio Verde e Campo Verde, Estado do Mato Grosso (Moreira et al., 2012).

Em Lucas do Rio Verde, os principais agrotóxicos detectados nas águas superficiais foram os herbicidas atrazina e metolacoloro; os inseticidas clorpirifós, permetrina, endosulfan α e β e malation; e o fungicida flutriafol. Nas águas de chuvas, 38,0% das amostras estavam contaminadas com resíduos de endosulfan-sulfato, 56,0% com metolacoloro e endosulfan β , 43,0% com atrazina e 51,0% com flutriafol. Para as águas superficiais e de chuva coletadas no município de Campo Verde, 53,0% estavam contaminadas com atrazina, 25,0% com metolacoloro e 44,0% com endosulfan α e β (Moreira et al., 2012).

A qualidade da água na sub-bacia do rio Poxim-Mirim e Poxim, no Estado de Sergipe, é influenciada pelo uso de herbicidas em culturas de cana-de-açúcar na região. As águas estavam contaminadas com herbicidas de alta tendência de lixiviação: metribuzim, diuron, atrazina, hexazinona, trifloxissulfurom-sódico, halossulfurom-metílico, 2,4-D, picloram e imazapir (Britto et al., 2012).

Marques et al. (2007) avaliaram a contaminação de águas de áreas de captação na Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, região sul do Estado de São Paulo, por agrotóxicos. Observaram que 14,0% das amostras de águas analisadas estavam contaminadas com resíduos de carbofurano, 3,0% com trifluralina, 2,0% com atrazina e 3,0% com simazina. Os autores constataram também que o alto índice pluviométrico na região aumentou o carreamento dos agrotóxicos para os rios da bacia, pois a maior incidência de amostras de água contaminadas ocorreu durante o período chuvoso.

Resíduos de ametrina foram detectados nas águas superficiais e nos sedimentos dos rios Sapucaí, Baixo Pardo, Pardo e Mogi-Guaçu, localizados no Estado de São Paulo e próximos a cultivos de cana-de-açúcar (Jacomini et al., 2011).

Diante desse índice elevado de entrada de resíduos de agrotóxicos nos ambientes aquáticos, o monitoramento da contaminação em corpos hídricos é fundamental para a gestão ambiental da qualidade das águas. A contaminação das águas da rede fluvial local por agrotóxicos pode auxiliar na tomada de decisão sobre as condições de aplicação desses insumos agrícolas e na adoção das técnicas de cultivo e de conservação do solo nas áreas cultivadas na microbacia.

3.3. Influência do sedimento de fundo na contaminação das águas por agrotóxicos

O sedimento de fundo dos ambientes aquáticos é um compartimento importante como indicativo da contaminação ambiental, pois é o depósito final de muitos contaminantes. A dinâmica dos contaminantes faz dos sedimentos de fundo um local de estocagem e uma fonte de poluentes (Zagatto e Bertoletti, 2008; Possavatz et al., 2014).

Quando os compostos orgânicos e inorgânicos atingem o ambiente aquático, uma parte significativa é ligada aos materiais particulados suspensos preexistentes no ambiente, que tende a depositar no fundo e a fazer parte dos sedimentos. A ligação ao material particulado no meio aquático ocorre por meio de processos como adsorção química (complexação, quelação e precipitação) e física (Zagatto e Bertoletti, 2008; Silva et al., 2013b). Esses processos, juntamente com o processo de dessorção, regulam a disponibilidade da molécula no ambiente aquático e, por consequência, a contaminação das águas superficiais e subterrâneas (Ribeiro et al., 2007).

Os contaminantes presentes nos sedimentos podem ser disponibilizados para a coluna d'água devido a mudanças em parâmetros como pH, potencial redox ou ação de microrganismos. Assim, a qualidade da água superficial é afetada pela qualidade do sedimento submerso, devido aos processos de equilíbrio dinâmico que se estabelece entre a água e o sedimento (Possavatz et al., 2014).

O processo de sorção é complexo e pode ocorrer através de pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, forças eletrostáticas, ligações covalentes e interações hidrofóbicas. Esses são os principais mecanismos contribuidores da adesão ou atração dos compostos à superfície do sedimento (Schreiber, 2012).

As características dos sedimentos como: estrutura e textura, teor de umidade, teores de matéria orgânica e argila, pH, capacidade de troca de cátions (CTC), área superficial específica e porosidade, afetam o grau de fluxo preferencial e transporte de moléculas no sedimento (Costa et al., 2004).

O comportamento dos agrotóxicos nos compartimentos ambientais, como os sedimentos, é influenciado por características físicas e químicas dos compostos, como solubilidade, coeficiente de sorção (K_{oc}), constantes de dissociação (pK_a ou pK_b), coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), pressão de vapor e meia vida (Oliveira e Brighenti, 2011).

A matéria orgânica e a capacidade de troca catiônica (CTC) dos colóides são os principais fatores determinantes do processo de sorção que ocorrem entre os materiais de origem orgânica e inorgânica e o sedimento. A adição de matéria orgânica atua de forma direta no aumento da adsorção dos materiais orgânicos e inorgânicos e de inversa na mobilidade desses materiais do sedimento (Ribeiro et al., 2007).

Além do potencial de sorção de agrotóxicos, a matéria orgânica também está relacionada com a atividade de microrganismos; mais intensa nas camadas superficiais do sedimento (Monteiro, 1996).

A argila representa a fração mineral do sedimento que tem a maior capacidade sorptiva de moléculas, devido à sua alta superfície específica ($8,0 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$); que corresponde à área exposta de determinado material por unidade de massa (Christoffoleti et al., 2008).

O movimento do herbicida tebutiuron foi estudado em sedimentos com diferentes valores de carbono orgânico e teores de argila. Em sedimentos com os mais baixos teores de matéria orgânica e de argila, a lixiviação foi 6,7 vezes maior, em relação aos sedimentos com os maiores teores. Portanto, esses fatores são determinantes para a lixiviação do herbicida tebutiuron (Gomes et al., 2006).

O pH da solução do sedimento é outro fator relevante na avaliação da capacidade sorçiva dos agrotóxicos. O potencial hidrogeniônico do sedimento afeta o comportamento de herbicidas ionizáveis. Quando o pH do sedimento apresenta valores próximos ou acima do pK_a ou pK_b da molécula, a capacidade de sorção dos agrotóxicos no sedimento é reduzida (Kogan e Pèrez, 2004; Christoffoleti et al., 2008).

A elevação do pH da solução do sedimento favorece o desenvolvimento de cargas negativas, que repelem as moléculas aniônicas dos herbicidas ácidos. Para herbicidas básicos, há uma menor afinidade de suas formas moleculares com a matriz do sedimento (Christoffoleti et al., 2008).

Outra característica a ser considerada no processo sortivo dos agrotóxicos ao sedimento é a solubilidade da molécula na água. A solubilidade é o reflexo da polaridade da molécula, ou seja, quanto maior é a polaridade, mais solúvel em água é a molécula (Schreiber, 2012).

Agrotóxicos solúveis, com algumas exceções, por exemplo, glifosato e organoclorados, apresentam baixos coeficientes de sorção nos sedimentos, em função da baixa afinidade dos compostos pelos colóides do sedimento (Oliveira e Brighenti, 2011).

Resíduos dos agrotóxicos metolaclo, permetrina, α -cialotrina, α -endossulfan, endossulfan sulfato, clorpirifós e malation foram identificados em amostras de sedimento de fundo da bacia hidrográfica do rio Cuiabá, Estado de Mato Grosso (Possavatz et al., 2014).

Em uma região do Estado de São Paulo com intenso cultivo de cana-de-açúcar, Armas, et al. (2007) detectaram a presença de ametrina e glifosato no sedimento de fundo da sub-bacia hidrográfica do Rio Corumbataí. Os resíduos de ametrina foram encontrados em níveis quantificáveis e os de glifosato em concentrações inferiores a $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$. A explicação para as baixas concentrações dos herbicidas encontradas no sedimento desse rio é a composição arenosa do sedimento que não propicia o acúmulo dos agrotóxicos na forma adsorvida.

Como o sedimento se caracteriza pela capacidade de acumular poluente, a investigação da contaminação desse compartimento ambiental é de suma

importância para a confirmação dos impactos negativos do uso dos agrotóxicos ao longo do tempo no corpo receptor (Hwang et al., 2009).

3.4. Contaminação da rede de drenagem por cafeína

Muitas substâncias são utilizadas pela humanidade antes de se conhecer os efeitos tóxicos que podem acarretar aos seres vivos e ao ambiente. Dentre essas se destaca a cafeína. A cafeína é um composto químico orgânico da classe das metilxantinas, tem a capacidade de estimular o sistema nervoso central e é a substância psicoativa mais consumida no mundo (Diogo et al., 2013; Canela et al., 2014).

Devido à importância da cafeína, Frary et al. (2005) realizaram estudos sobre as diferentes fontes de cafeína e constataram que 70,0% provêm do café, 12,0% de chás e 16,0% de refrigerantes. A cada 240,0 mL de café solúvel existem cerca de 100,0 mg de cafeína (Belay et al., 2008). Além dessas fontes principais, a cafeína ainda é encontrada naturalmente nas folhas de chá verde (*Camilla sinensis*), cacau (*Theobroma cocoa*), guaraná (*Paulinia cupana*) e erva-mate (*Ilex paraguayensis*) (De Maria e Moreira, 2007), e sinteticamente em fármacos diversos.

Após o consumo, a cafeína é rapidamente absorvida e metabolizada em humanos. A excreção ocorre em até 48 horas, e 1,0 a 5,0% da cafeína é excretada inalterada pela urina (Nawrot et al., 2003). Portanto, a contaminação de corpos d'água com cafeína está diretamente relacionada com a contaminação das águas com o esgoto sanitário bruto das cidades e a concentração da cafeína no esgoto. Geralmente, grande parte do esgoto sanitário bruto, tratado ou não, é descartado em corpos aquáticos (Figura 3) (Spongberg et al., 2011; Valcárcel et al., 2011; Kurissery et al., 2012). Os resíduos da cafeína do esgoto urbano despejado na rede fluvial (Figura 3) pode inclusive retornar para a água de consumo humano (Canela et al., 2014).

A presença de cafeína em afluentes de estações de tratamento de esgoto está relacionada às características físicas e químicas da molécula, que controlam a interação entre as fases líquida e sólida do esgoto (Canela et al., 2014).

A cafeína tem elevada solubilidade em água ($20,0 \text{ g L}^{-1}$) e, em solventes de média polaridade e apolares, pressão de vapor $4,7 \cdot 10^{-6} \text{ Pa}$ e coeficiente de partição octanol/água de 0,8. A cafeína tem estrutura molecular estável; que resulta em baixa reatividade em condições normais de temperatura e pressão (CAS, 2002; Canela et al., 2014).



Figura 3. Rotas de transporte de cafeína a partir do seu descarte em sistema de esgoto sanitário. Fonte: Canela et al. (2014).

A presença de cafeína em corpos d'água superficiais e subterrâneos é considerada como um indicador da contaminação das águas por esgoto doméstico. Ghiselli (2006) determinou a presença de cafeína em águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas/SP, na sub-bacia do Rio Atibaia. Entre os compostos monitorados, a cafeína foi detectada nas águas superficiais e potáveis na concentração entre $1,0$ a $106,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Em amostras de águas do rio Paquequer, no Rio de Janeiro, foram detectadas concentrações de cafeína entre $0,2$ a $47,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e as maiores

concentrações foram encontradas em locais próximos da área urbanizada (Gonçalves, 2008).

A presença de inúmeros contaminantes emergentes em amostras de mananciais e águas tratadas distribuídas à população de Campinas e suas possíveis atividades estrogênicas foram detectadas por Raimundo (2011). Neste estudo foi demonstrada uma correlação positiva entre os níveis de contaminantes emergentes com as atividades estrogênicas e a cafeína. Esse estudo foi corroborado por Montagner et al., (2014).

Sodré et al. (2010a) detectaram, em amostras de águas superficiais da Bacia do Rio Atibaia, concentrações entre 0,0022 e 0,039 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrogênios endógenos, sendo o bisfenol o composto mais frequentemente detectado. Nessas mesmas águas também foi detectada a presença de cafeína em concentrações de 0,22 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Sodré et al. 2010b).

Em decorrência das baixas concentrações de cafeína nos afluentes frente ao elevado consumo humano, certamente há muitas outras substâncias cuja regulamentação na água potável deveria ser priorizada (Canela et al., 2014). No entanto, a determinação quantitativa de cafeína é de grande importância, não apenas para o estabelecimento do verdadeiro cenário de contaminação ambiental, mas também como indicador da presença de outros contaminantes emergentes, especificamente interferentes endócrinos.

O conhecimento desse cenário é fundamental na gestão ambiental da qualidade das águas fluviais como na seleção e proposição de medidas de controle da contaminação, seja por meio de melhorias no sistema de tratamento de esgoto e água ou formulação de legislações pertinentes.

3.5. Ensaios ecotoxicológicos para o monitoramento da qualidade da água

A intensa atividade agrícola e o uso de agrotóxicos têm aumentado significativamente a ocorrência de resíduos nos cursos d'água (Zagatto e Bertolotti, 2008). O transporte de agrotóxicos das lavouras para a rede fluvial resulta em ação tóxica direta ou indireta sobre organismos não alvos do controle

químico (Nakagome et al., 2006). Diante desse fato, os ensaios ecotoxicológicos têm sido muito utilizados nos últimos anos para monitorar a qualidade das águas (Magalhães e Filho, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos são aplicados para estabelecer limites permissíveis, ou aceitáveis, para diversas substâncias químicas nas águas das redes fluviais e para avaliar os riscos e os impactos dos poluentes sobre os organismos de um determinado ambiente (Costa et al., 2008).

Assim, os ensaios ecotoxicológicos são importantes para determinar a influência direta de atividades antrópicas e/ou naturais por meio da determinação do grau de toxicidade das águas contaminadas dos corpos hídricos (Magalhães e Filho, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos são classificados em agudos e crônicos, cujas diferenças básicas são o tempo e a concentração de exposição dos organismos aos compostos químicos e as respostas finais quantificadas (Costa et al., 2008).

A resposta avaliada em estudos de toxicidade aguda é a letalidade (vertebrados) ou manifestações que a antecede, como o estado de imobilidade (invertebrados). Nesses estudos são determinados os valores de CE_{50} (concentrações efetivas medianas que causa 50,0% do efeito nos organismos-teste) e CL_{50} (concentrações letais medianas que causa 50,0% de mortalidade dos organismos-teste) (Costa et al., 2008).

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda são utilizados como base para estudos mais criteriosos como ensaios de toxicidade crônica e avaliações de riscos de intoxicação ambiental (Lombardi, 2015).

Nos ensaios de toxicidade crônica são determinados os efeitos adversos dos contaminantes em exposições prolongadas a concentrações subletais. A exposição ao agente estressor pode não levar o organismo a morte, mas pode causar distúrbios fisiológicos, morfológicos e/ou comportamentais (Zagatto e Bertoletti, 2008).

As avaliações de riscos são utilizadas para comparar as exposições com os níveis de aceitabilidade de risco e estabelecer as necessidades de implementar medidas e ações para controlar ou minimizar os impactos ambientais negativos, de forma a manter a integridade física, química e biológica dos ecossistemas

(Herricks, 2002). Os resultados das avaliações de risco também são utilizados para a aprovação, a proibição ou a restrição do uso de agrotóxicos (Souza, 2008).

Nos ensaios ecotoxicológicos são utilizados organismos bioindicadores de contaminação ambiental, que, devido às suas características de baixa tolerância a contaminantes, reagem à presença com alterações de suas funções vitais normais (Magalhães e Filho, 2008).

Os ensaios devem ser realizados com organismos pertencentes, a pelo menos, três níveis tróficos das cadeias biológicas aquáticas. Os principais organismos aquáticos utilizados como bioindicadores em ensaios laboratoriais são os microcrustáceos, macrófitas e peixes (Magalhães e Filho, 2008; Zagatto e Bertolletti, 2008).

Entre os critérios relevantes na seleção dos organismos-teste nos ensaios ecotoxicológicos é a disponibilidade de cultivo em condições de laboratório, a representatividade do ecossistema e a sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos; para possibilitar a obtenção de resultados precisos, exatos e reprodutíveis (Domingues e Bertolletti, 2006).

A aplicação dos ensaios ecotoxicológicos na análise ambiental tem sido crescente e de acordo com as transformações químicas no ambiente. Na Tabela 1 se observa estudos ecotoxicológicos com herbicidas e inseticidas com organismos bioindicadores da contaminação ambiental. Esses estudos são realizados para se avaliar a capacidade dos agrotóxicos causarem efeitos deletérios nos organismos.

Os ensaios ecotoxicológicos, com todas as possibilidades que encerram na mensuração da poluição ambiental, permitem ainda desenvolver estudos científicos para se determinar a capacidade de assimilação do meio, a compreensão dos processos naturais, os efeitos dos poluentes sobre o homem e aos ecossistemas (Sanchez, 2013).

Tabela 1. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas aplicados em cultura de cana-de-açúcar para organismos aquáticos bioindicadores da contaminação ambiental.

Espécies	Agrotóxicos	Tempo de exposição	CE ₅₀ / CI ₅₀ / CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	Referência
<i>D. magna</i>	Imidacloprid	48 horas	432,6	Hayasaka et al. (2012)
	2,4D	48 horas	100,0	Rebelo e Caldas (2014)
	Atrazina	48 horas	50,4	Moreira et al. (2014)
	Ametrina	48 horas	28,0 - 45,2	Rebelo e Caldas (2014)
	Diuron	48 horas	1,0 - 17,0	Rebelo e Caldas (2014)
	Fipronil	48 horas	0,09	Hayasaka et al. (2012)
	Glifosato	48 horas	0,012	Sarigul et al. (2009)
	Carbaril	48 horas	0,012	Martins et al. (2007)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Malation	48 horas	0,001	Martins et al. (2007)
	Hexazinona	48 horas	105,5	Silva et al. (2013a)
	Diuron	48 horas	2,9	Silva et al. (2013a)
	Imidacloprid	48 horas	0,5	Hayasaka et al. (2012)
<i>Azolla caroliniana</i>	Fipronil	48 horas	0,00099	Hayasaka et al. (2012)
	2,4-D	7 dias	708,3	Silva et al. (2012a)
	Clomazone	7 dias	129,6	Silva et al. (2012a)
	Glifosato (Trop®)	7 dias	38,9	Silva et al. (2012a)
<i>L. minor</i>	Glifosato (Scout®)	7 dias	23,6	Silva et al. (2012a)
	Imidacloprid	7 dias	740,0	Daam et al. (2013)
	Imazapir	7 dias	1,0	Cruz et al. (2015)
	Atrazina isoproturon	21 dias	0,07	Coutris et al. (2011)
<i>Danio rerio</i>	Diuron	7 dias	0,0283	Gatidou et al (2015)
	2,4D	48 horas	237,1	Nakagome et al. (2007)
	Malation	96 horas	19,8	Martins et al. (2007)
	Carbaril	96 horas	14,4	Pandey e Guo. (2015)
<i>O. niloticus</i>	Clomazone	48 horas	13,8	Nakagome et al. (2007)
	Atrazina	96 horas	5,0	Botelho et al. (2009)
	Ametrina	96 horas	5,4	Iseki et al. (2012)
	Diquat	96 horas	37,3	Henares et al. (2008)

3.5.1. Organismos indicadores da contaminação ambiental

3.5.1.1. *Lemna minor*

A macrófita aquática *L. minor* têm grande importância ecológica, atua no armazenamento de nutrientes, no fluxo de energia do ambiente e representa a base das teias alimentares (Thomaz, 2002). As lemnas pertencem ao filo das

angiospermas, classe das Monocotiledôneas e família das Araceas (Souza, 2008).

A *L. minor* (Figura 4) é uma planta aquática encontrada em diversos climas e a reprodução se dá por meio da formação de frondes (folhas) novas a partir do amadurecimento de frondes mais velhas (Souza, 2008).

A *L. minor* tem diversas características que a torna apta para ser utilizada como bioindicadora em ensaios ecotoxicológicos, como a maior taxa de crescimento entre os vegetais superiores, alta sensibilidade, facilidade de manejo e reprodução em condições de laboratório (Kiss et al., 2003).



Figura 4. Macrófita aquática *L. minor*, vulgarmente conhecida como lentilha d'água.

A distribuição e a abundância das macrófitas aquáticas dependem de fatores como a quantidade e a qualidade de luz disponível. A intensidade luminosa tem um papel essencial para fisiologia desses organismos, uma vez que afeta a produtividade das plantas (Camargo et al., 2003; Tundisi e Tundisi, 2008). As taxas ótimas de crescimento para *L. minor* ocorrem em intensidades de luz entre 18.500,0 e 22.200,0 lux (Tabou et al., 2014).

A temperatura também é uma característica física da água que influencia diretamente na produção primária das macrófitas aquáticas, por controlar a velocidade de suas reações químicas (Kirk, 2010). As altas temperaturas aceleraram as reações metabólicas, de forma a favorecer a produção primária das plantas (Geneviève et al., 1997).

A disponibilidade de nutrientes, em especial nitrogênio (N) e fósforo (P), representa um dos principais fatores que controlam as taxas de crescimento das macrófitas aquáticas. Taxas mais elevada de crescimento ocorrem com altas concentrações de nutrientes (Tundisi e Tundisi, 2008).

O N e o P são elementos essenciais, pois fazem parte de moléculas que atuam nos processos metabólicos das plantas. O N é um importante constituinte das proteínas e o P é um dos compostos celulares relacionados ao armazenamento de energia das células. A falta desses nutrientes afetam importantes processos fisiológicos dos vegetais, como fotossíntese e respiração (Salisbury e Ross, 1992; Larcher, 2000).

A condutividade elétrica da água também é um fator importante para o crescimento de macrófitas aquáticas, uma vez que as concentrações de íons e teores de nutrientes dissolvidos apresentam relação positiva com a condutividade elétrica da água (Thomaz et al., 2003; Tundisi e Tundisi, 2008).

O pH é um parâmetro da água que afeta indiretamente a taxa de crescimento de macrófitas aquáticas e é responsável pela disponibilidade de elementos importantes na solução aquosa como fosfato, sulfato, ferro e manganês. Os valores de pH acima de 6,5 podem causar a precipitação desses elementos e torná-los indisponíveis à planta e prejudicar o desenvolvimento dos vegetais (Braccini et al., 1999).

O pH também influencia na proporção do carbono orgânico dissolvido na água, representado pelas moléculas CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- e CO_3^- . Essas moléculas controlam a produtividade dos vegetais, pois são essenciais à fotossíntese. Valores de pH próximos ou superiores a 7,0 proporcionam maior disponibilidade de HCO_3^- , o que provoca redução na taxa fotossintética das macrófitas, pois as plantas utilizam, em maiores proporções, o CO_2 para a realização de fotossíntese (Pierini e Thomaz, 2004; Biudes e Camargo, 2008).

3.5.1.2. *Daphnia magna*

A *D. magna* é o organismo mais utilizado em ensaios ecotoxicológicos como representante dos invertebrados aquáticos. A *D. magna* é um microcrustáceo, popularmente conhecido como pulga d'água (Figura 5), com comprimento entre 0,2 e 3,0 mm e habita todos os tipos de água doce (Tavares e Rocha, 2002).

A classificação taxonômica da *D. magna*, de acordo com Paggi, 1995 (Tavares e Rocha, 2002), é a seguinte: Filo: Arthropoda; Classe: Cladocera; Ordem: Anomopoda; Família: Daphnidae e Gênero: *Daphnia*.

Como parte do zooplâncton, a *D. magna* ocupa uma posição ecológica importante nas teias tróficas aquáticas, uma vez que alterações nas populações podem ter consequências importantes na dinâmica de todo o ecossistema aquático (Inácio et al., 2010).

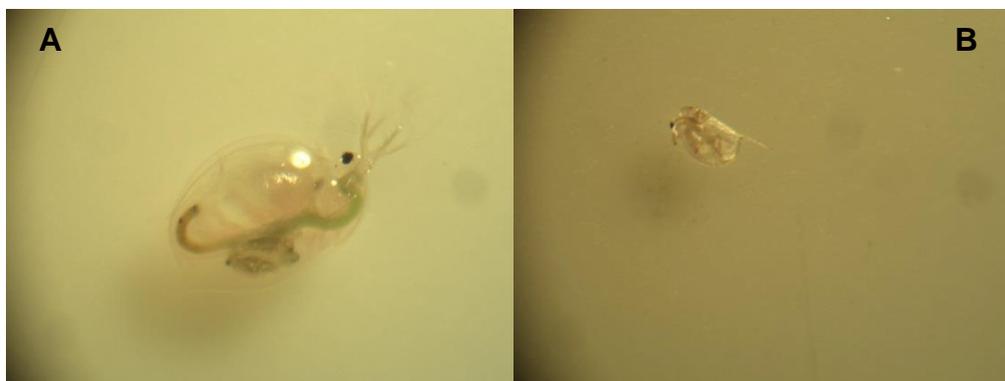


Figura 5. Exemplar do microcrustáceo *D. magna* adulto (A) e neonato (B).

As principais características da *D. magna* são: ciclo de vida curto, facilidade de adaptação às condições de laboratório, facilidade de manejo e sensibilidade a uma grande variedade de contaminantes. Essas características tornam as daphnias adequadas para ensaios laboratoriais de toxicidade e um ótimo modelo para avaliação do ecossistema aquático (Villarroel et al., 2003; Arauco et al., 2005).

Outra característica muito importante que tornam as daphnias aptas à modelo biológico é a reprodução por partenogênese; que assegura a produção de organismos geneticamente idênticos e com sensibilidades constantes (Tatarazako et al., 2003; Buratini et al., 2004).

3.5.1.3. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (Figura 6) é uma espécie de peixe encontrada em quase todo o país, e está entre as espécies mais cultivadas em pesque-pague e, por conseguinte, a mais popular no Brasil (Hilsdorf, 2007). A alta qualidade da carne faz da tilápia um produto de grande interesse para o processamento industrial e de boa aceitação pelo mercado consumidor (Dias et al., 2007).

A classificação taxonômica da tilápia de acordo com Linnaeus, 1758, é a seguinte: Filo: Chordata; Classe: Osteichthyes; Ordem: Perciformes; Família: Cichlidae; Gênero: *Oreochromis* e Espécie: *niloticus*.



Figura 6. Exemplar de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

A espécie *Oreochromis niloticus* é reconhecida como modelo biológico, devido a fácil manipulação, adaptação ao cativeiro, manutenção em laboratório e sensibilidade a presença de poluentes (Almeida et al, 2002; Wu et al., 2008).

Todos esses atributos levam a espécie a ser considerada adequada para ensaios laboratoriais de toxicidade e ótimo modelo para avaliação da toxicidade do ecossistema aquático. Portanto, a tilápia frequentemente é utilizada em estudos de toxicidade de substâncias contaminantes em ecossistemas aquáticos (Alves-Costa, 2001; Girón-Pérez et al., 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

Os pesque-pague, locais de amostragens do presente estudo, estão inseridos em áreas de intenso cultivo de cana-de-açúcar nas regiões administrativas de Ribeirão Preto e Central, no Estado de São Paulo.

Os pesque-pague estão inseridos nas Bacias hidrográficas do Mogi-Guaçu e Tietê/Batalha (Figuras 7A e B).

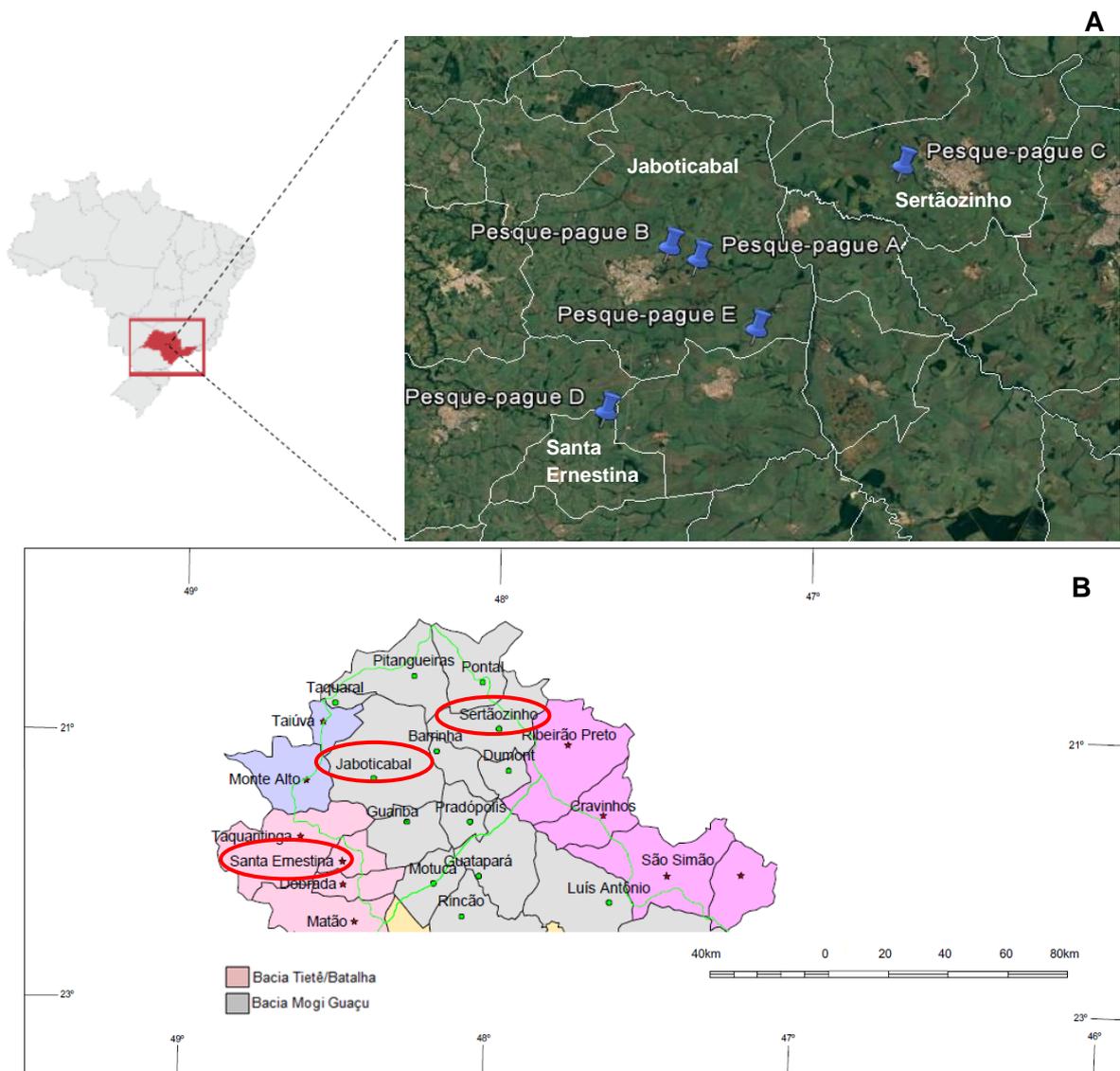


Figura 7. Localização dos pesque-pague na região do Estado de São Paulo (A) e Localização da Bacia do Mogi Guaçu e do Tietê/Batalha (B). Fonte: Google Earth (2016) e Diagnóstico da Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu – “Relatório Zero”, 1999.

Na Tabela 2 estão apresentados os dados da localização dos pesque-pague, obtidos no mapa topográfico do IBGE, fotografias aéreas e imagens orbitais do *Google Earth*.

Tabela 2. Dados da localização dos pesque-pague estudados.

Pesque-Pague	Latitude (m)	Longitude (m)	Altitude (m)	Município	Localização
A	7649194,97	780932,76	604	Jaboticabal	Nascente do Córrego do Cerradinho ou do Córrego de Jaboticabal, afluente do Córrego Rico
B	7648476,36	784727,64	581	Jaboticabal	Nascente do Córrego do Cerradinho ou do Córrego de Jaboticabal, afluente do Córrego Rico
C	7659327,13	806343,56	573	Sertãozinho	Próximo à nascente do Córrego da Vendinha, afluente do Córrego do Ribeirão do Sul ou do Sertãozinho
D	7631466,79	774507,62	632	Santa Ernestina	Afluente do Córrego do Coco
E	7640075,87	789601,72	642	Jaboticabal	Próximo ao Córrego da Inhaúma ou Santa Miquelina

O clima característico da área de estudo, de acordo com a classificação de Köppen, é o mesotérmico de inverno seco. De acordo com essa classificação climática, a temperatura média do mês mais frio é inferior a 18°C e a do mês mais quente ultrapassa 22°C.

A precipitação média desse tipo climático varia entre 1.100 e 1.700 mm por ano, sendo que no período de outubro a março, ocorrem 80% das chuvas anuais e no período de abril a setembro apenas 20%, onde Julho atinge as menores precipitações ^{2,3}.

A província geomorfológica da área de estudo é o Planalto Ocidental, característico de grande uniformidade, com relevo plano, ondulado e suave ondulado, com predomínios de baixas e amplas colinas e altitudes que oscilam entre 400 a 600 metros ^{2,3}.

² Diagnóstico da Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu – “Relatório Zero”, 1999. <http://www.sigrh.sp.gov.br/public/uploads/documents/7106/relmogiseg.pdf> (acesso em 07.04.2017).

³ Plano diretor de recomposição florestal visando à conservação dos recursos hídricos na Bacia Hidrográfica do Tietê-Batalha, 2014. <http://www.comitetb.sp.gov.br/> (acesso em 07.04.2017).

As principais unidades de solo da área de estudo são classificadas, de acordo com o mapa pedológico do Estado de São Paulo, como Latossolos, característicos de textura argilosa, arenosa e média e de alta a baixa fertilidade natural^{2,3}.

Quanto ao material geológico, este é constituído de arenitos, siltitos, argilitos e conglomerados, inseridos na Formação Adamantina, Serra Geral e Bauru^{2,3}.

As bacias hidrográficas em estudo apresentam como principal cultura comercial a cana-de-açúcar (BRASIL, 2010).

4.2. Modelo digital de elevação da área de estudo – MDE

O levantamento topográfico das áreas das microbacias dos pesque-pague foi realizado para caracterizar o relevo no entorno dos empreendimentos aquícolas estudados e para avaliar a influência do relevo no fluxo das águas nas áreas do estudo.

Os pontos de coleta de água e de sedimento das cinco microbacias foram cadastrados no aparelho receptor portátil GNSS (*Global Navigation Satellite Systems*) do sistema GPS (*Global Positioning System*).

Com os pontos cadastrados e com a análise visual das imagens no programa *Google Earth* foi gerado uma representação matemática da distribuição espacial dos pontos. Esses pontos foram processados no programa Survey (2011) para a elaboração do modelo digital de elevação do terreno.

As simulações do caminho de escoamento da água superficial e dos modelos digitais de elevação dos terrenos, realizados em cada microbacia estudada, podem ser visualizadas nas figuras 8A e B, 9A e B, 10A e B, 11A e B e 12A e B. As setas indicam o sentido do fluxo da água.

A

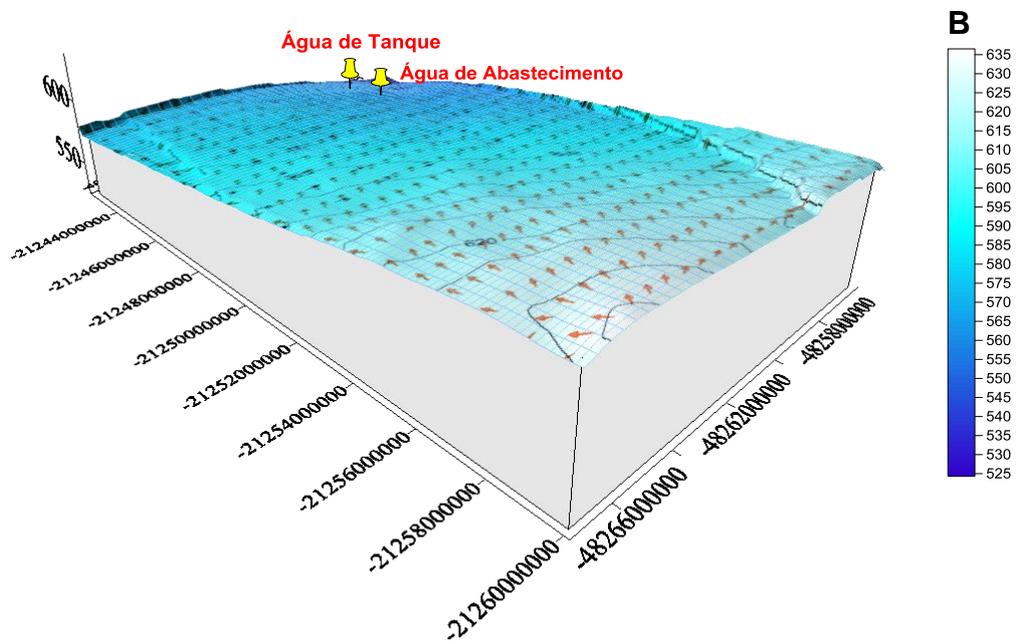


Figura 8. Simulação do fluxo de água (A) e Modelo digital de elevação (MDE) (B) para a microbacia em que se insere o pesque-pague A.

A

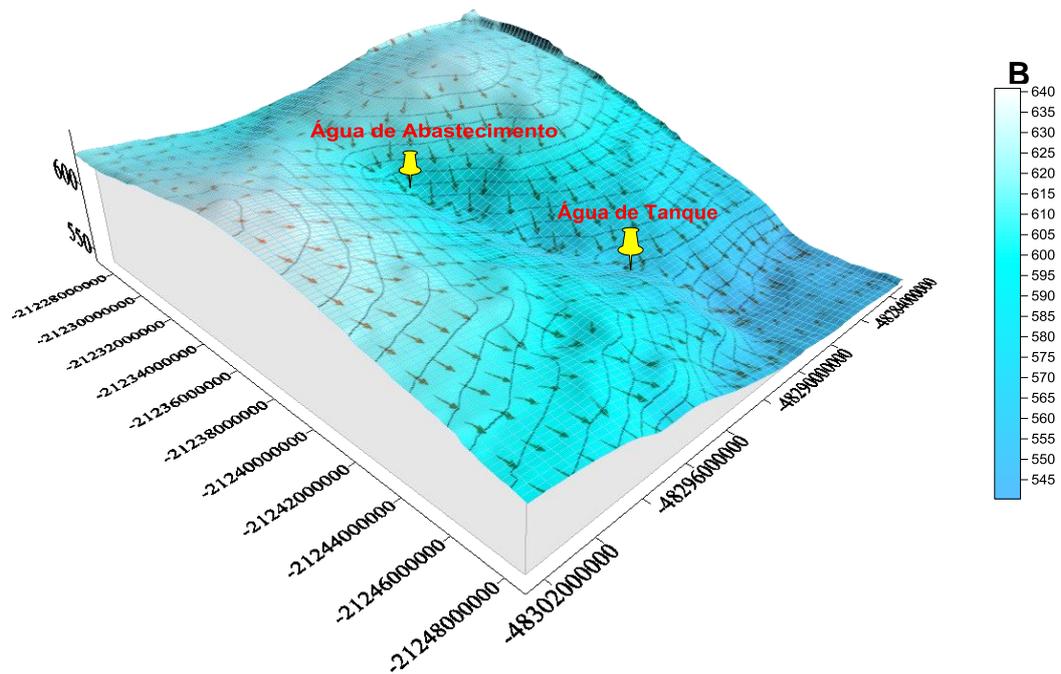
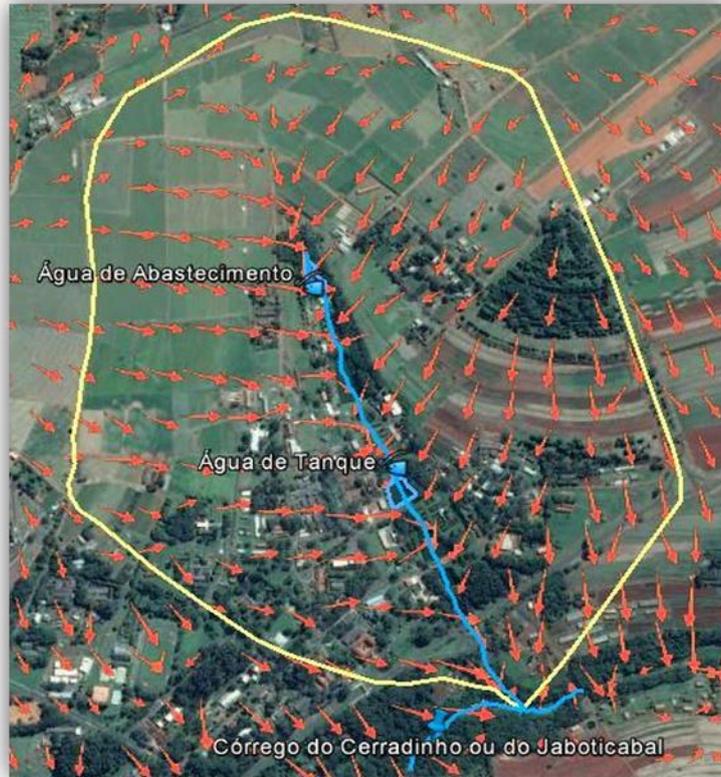
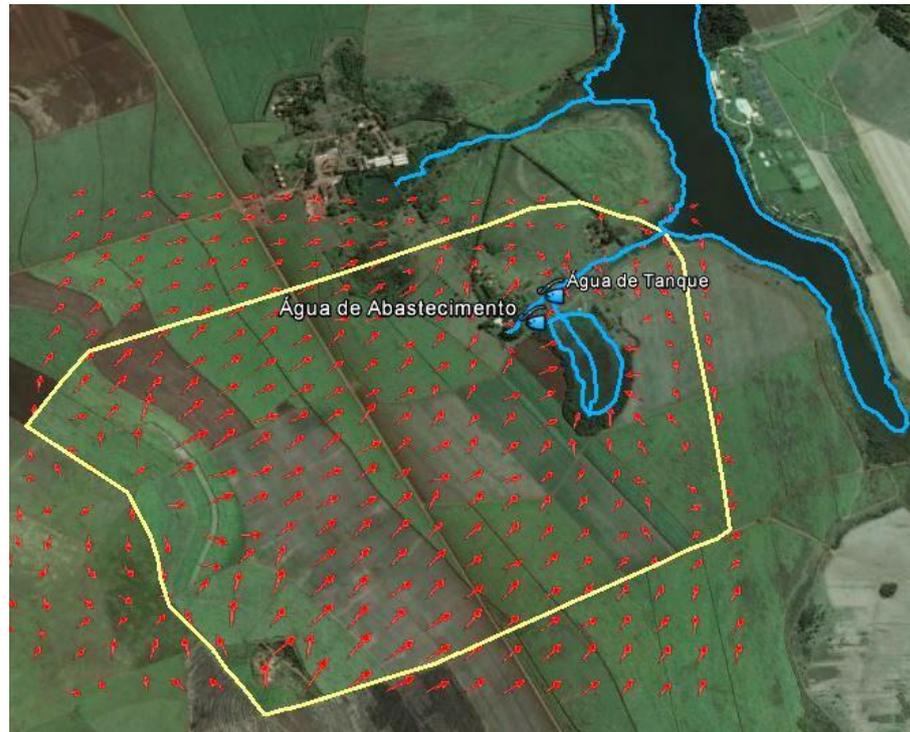


Figura 9. Simulação do fluxo de água (A) e Modelo digital de elevação (MDE) (B) para a microbacia em que se insere o pesque-pague B.

A



B

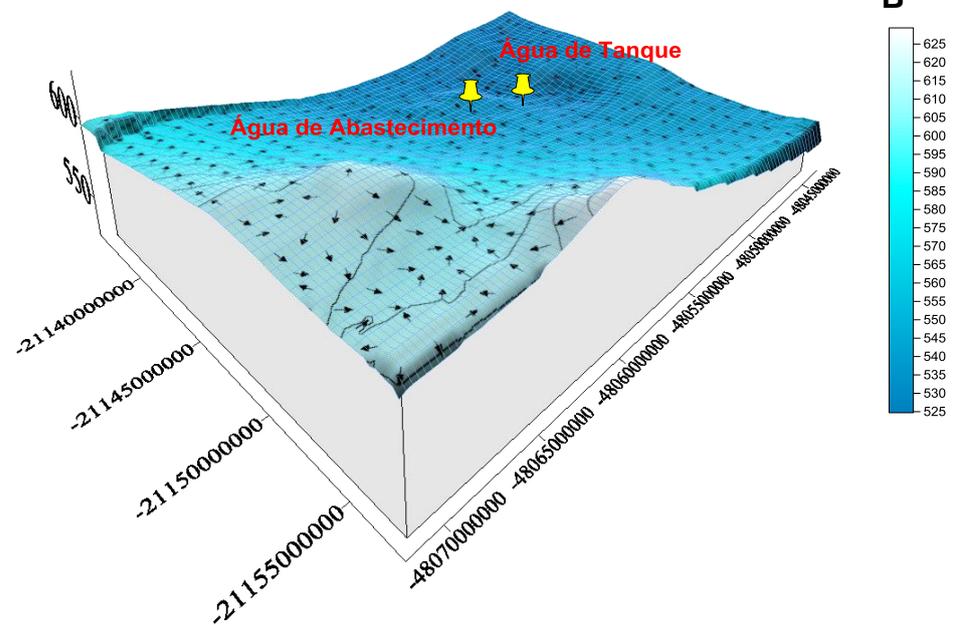


Figura 10. Simulação do fluxo de água (A) e Modelo digital de elevação (MDE) (B) para a microbacia em que se insere o pesque-pague C.

A

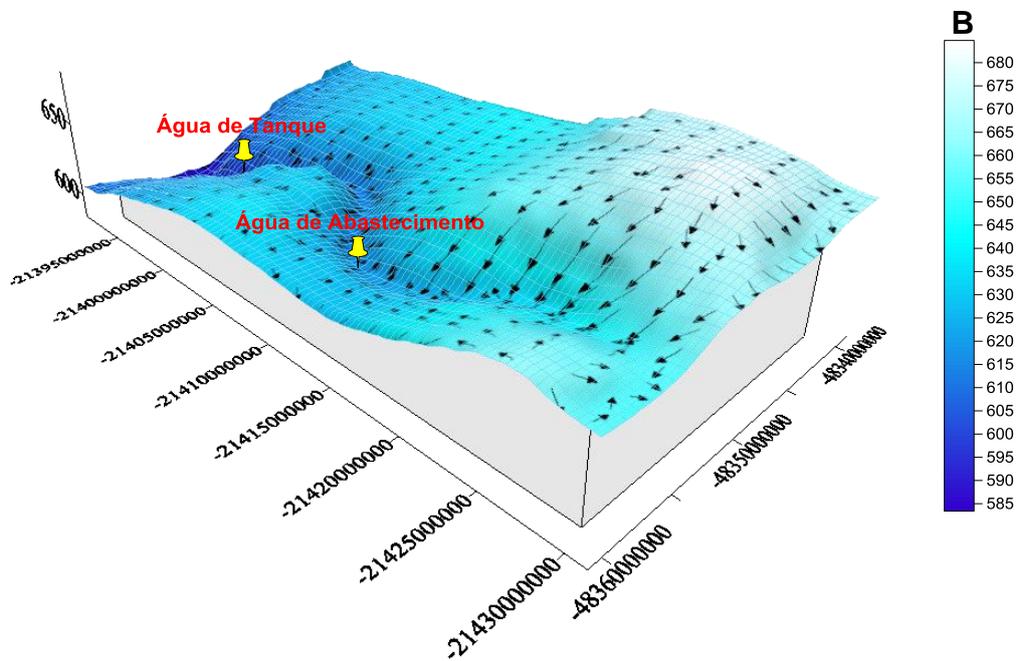


Figura 11. Simulação do fluxo de água (A) e Modelo digital de elevação (MDE) (B) para a microbacia em que se insere o pesque-pague D.

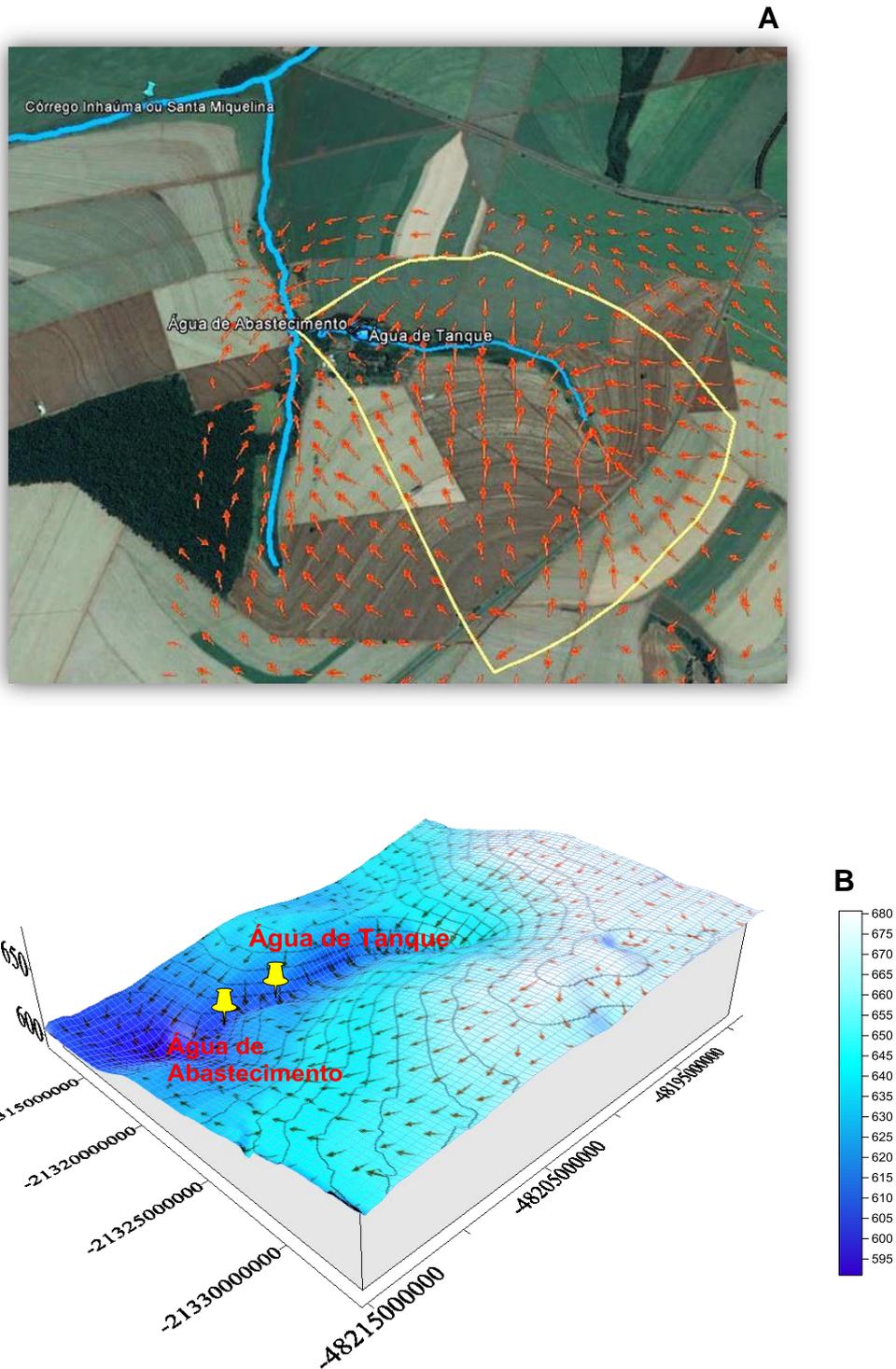


Figura 12. Simulação do fluxo de água (A) e Modelo digital de elevação (MDE) (B) para a microbacia em que se insere o pesque-pague E.

4.3. Procedimento de amostragem das águas e sedimento

As amostragens das águas foram realizadas nos afluentes (água de abastecimento dos pesque-pague) e nos tanques de peixes. As coletas foram efetuadas sempre no período da manhã, trimestralmente, entre Junho/2014 e Maio/2015, para abranger:

- **Estação das Chuvas** (Janeiro, Fevereiro, Março, Abril e Maio).
- **Estação das Estiagens** (Junho, Julho, Agosto, Setembro, Outubro e Novembro).

Nestes mesmos períodos e concomitantemente com as amostragens de água, também foram coletadas amostras de sedimento de fundo dos tanques de peixes.

As coletas de água foram realizadas de acordo com o procedimento estabelecido na Norma ABNT NBR 9898 (1987) e no Guia Nacional de Coletas e Preservação de Amostras da CETESB (2011).

Para a coleta simples das águas de afluente e de tanque, o coletor (balde de volume de 1,0 L) foi posicionado contra a corrente d'água, cerca de 15,0 a 30,0 cm abaixo da superfície da água, até o seu preenchimento. Posteriormente, a água coletada foi transferida para um balde de polipropileno graduado, com capacidade de 10,0 L (Figura 13A).

As coletas simples foram realizadas em dez pontos distintos do afluente e do tanque de peixes. No balde de polipropileno, as amostras das águas coletadas foram homogeneizadas de forma a constituir amostras compostas. Estas foram transferidas para frascos de plástico de capacidade de 1,0 L, devidamente etiquetados e revestidos por papel alumínio (Figura 13B).

Ao final do período de coleta obteve-se para cada pesque-pague, um n amostral igual a oito; sendo $n = 4,0$ para água de afluente e $n = 4,0$ para água do tanque, totalizando no período de Junho/2014 e Maio/2015 $n = 40,0$ amostras.

Os frascos de coleta e os baldes foram previamente lavados com água, detergente extran neutro e álcool, conforme o procedimento estabelecido na Norma ABNT NBR 13073 (2003).

As coletas de sedimento de fundo dos tanques de peixes foram realizadas de acordo com o procedimento estabelecido no Guia Nacional de Coletas e Preservação de Amostras da CETESB (2011). Um total de 20,0 amostras de sedimento de fundo, com aproximadamente 1,0 kg, foram coletadas durante o período de Junho/2014 a Maio/2015.

Para compor as amostras compostas, foram realizadas dez coletas simples dos sedimentos de fundo em pontos distintos no tanque de peixes dos pesque-pague, na profundidade de 0,0 a 10,0 cm.

**A****B**

Figura 13. Balde de polipropileno (A) e frascos de plásticos revestidos com papel alumínio (B) utilizados nas coletas de água dos afluentes e tanques de criação de peixes dos empreendimentos aquícolas avaliados.

As coletas foram realizadas com um trado com caçamba de 10,0 cm e diâmetro de uma polegada e meia. Em seguida, as amostras foram acondicionadas e homogeneizadas em sacos plásticos devidamente identificados (Figura 14).

As amostras de água e sedimento foram transportadas ao Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional, da UNESP, Câmpus de Jaboticabal em caixas isotérmicas, com a presença de bolsas de gelo em gel, para manter a temperatura, proteger da luz e do calor. Em seguida foram armazenadas em freezers a -20°C (ABNT 9898, 1987; SPADOTTO et al., 2004).



Figura 14. Procedimento de coleta e armazenagem do sedimento de fundo dos tanques de peixes dos empreendimentos aquícolas avaliados.

4.4. Propriedades físicas e químicas do sedimento de fundo dos tanques de peixes

Para a determinação das características físicas e químicas do sedimento de fundo dos tanques de peixes dos pesque-pague, uma parte do sedimento coletado foi transportada para o laboratório de Manejo e Conservação do Solo do Departamento de Solos e Adubos da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

As análises físicas e químicas das amostras de sedimento de fundo dos tanques dos pesque-pague, para fins de fertilidade, foram realizadas de acordo com os procedimentos estabelecidos na norma ABNT NBR 7181 (1984) e no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997).

Na Tabela 3 estão apresentadas as características físicas, químicas e de micronutrientes dos sedimentos de fundo dos tanques de peixes dos cinco pesque-pague.

Tabela 3. Análise química, granulométrica e de fertilidade do sedimento de fundo do tanque de peixes na profundidade de 0,0 a 10,0 cm.

Composição Química	Unidades	Pesque-Pague				
		A	B	C	D	E
pH	CaCl ₂	5,0	5,4	5,3	4,5	4,7
M.O	g.dm ³	10,0	13,0	18,0	9,0	45,0
P	mg dm ³	17,0	98,0	35,0	5,0	31,0
K	mmolc.dm ³	1,2	2,4	0,9	1,0	2,3
Ca	mmolc.dm ³	18,0	37,0	25,0	7,0	23,0
Mg	mmolc.dm ³	11,0	19,0	9,0	3,0	12,0
H+Al	mmolc.dm ³	31,0	34,0	31,0	28,0	64,0
SB	mmolc.dm ³	30,2	58,4	34,9	11,0	37,3
CTC	mmolc.dm ³	61,2	92,4	65,9	39,0	101,3
V	%	49,0	63,0	53,0	28,0	37,0
Micronutrientes, S-SO₄ e Al						
B	mg dm ³	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3
Cu	mg dm ³	6,0	1,0	4,4	0,6	1,0
Fe	mg dm ³	135,0	162,0	168,0	236,0	218,0
Mn	mg dm ³	6,2	4,6	4,6	12,0	11,8
Zn	mg dm ³	1,1	3,3	1,9	0,6	1,4
S-SO ₄	mg dm ³	5,0	4,0	13,0	3,0	7,0
Al	mmolc.dm ³	0,0	0,0	0,0	3,0	5,0
Granulometria						
Argila	g kg ⁻¹	542,0	521,0	521,0	157,0	326,0
Silte	g kg ⁻¹	168,0	100,0	195,0	2,0	392,0
Areia fina	g kg ⁻¹	192,0	141,0	147,0	305,0	192,0
Areia grossa	g kg ⁻¹	98,0	238,0	137,0	536,0	90,0
Classe Textural		Argilosa	Argilosa	Argilosa	Média	Média

M.O: Matéria Orgânica; H+Al: Hidrogênio + Alumínio; SB: Soma de Bases; CTC: Capacidade de Toca de Cátions; V: Porcentagem de saturação de Bases.

4.5. Quantificação dos resíduos de agrotóxicos e cafeína

As determinações dos agrotóxicos e da cafeína nas amostras de água e sedimento de fundo foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplada à Espectrometria de Massas. Ao longo das etapas analíticas, foram empregados reagentes de grau analítico e água desionizada (18,8 MΩ).

O sistema cromatográfico (Figura 15) é composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, equipado por duas bombas LC-20AD, injetor automático SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (controle da temperatura da coluna). Acoplado ao CLAE está o espectrômetro de massas 3200 Q TRAP (Applied Biosystems), com híbrido triplo quadrupolo (Q1, Q2 e Q3) e com ionização pelo processo eletrospray.



Figura 15. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu, modelo Proeminence UFLC (A) e espectrômetro de massas 3200 Q TRAP Applied Biosystems (B).

A coluna cromatográfica utilizada para a determinação dos analitos foi a C₁₈, marca Synergi 2.5 μ Hydro-RP 100,0 Å, de dimensões 50,0 x 4,6 mm, na vazão de 0,4 mL min⁻¹ e volume aplicado de 30,0 μ L.

Após a separação dos analitos no cromatógrafo líquido de alta eficiência, de forma conjunta, o espectrômetro de massas recebe os compostos e a partir dos mesmos, cria os íons carregados. A relação massa/carga dos analitos permite ao detector avaliar os íons gerados e caracterizá-los através de padrões de fragmentação.

Dos três quadrupolos presentes no espectrômetro de massas, o Q1 é utilizado como filtro de massa e o Q2 é uma célula de colisão, onde as moléculas intactas e os fragmentos de Q1 são quebrados em fragmentos de massa menor.

O Q3 é definido para selecionar os fragmentos que serão analisados e os enviarem ao detector que produz o sinal traduzido no cromatograma de íons totais.

Para separação dos compostos adotou-se sistema de eluição em gradiente, iniciando-se com a mistura metanol e água e 0,5% de ácido acético. A proporção entre os solventes teve início em 20:80 (metanol:água), passados oito minutos a proporção atingiu 95:5, que se manteve até 12,0 minutos, e aos 15,0 minutos, retornou à condição inicial. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 19,0 minutos.

As análises cromatográficas foram realizadas no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, Câmpus de Botucatu/SP. A validação do método cromatográfico foi realizada de acordo com os parâmetros recomendados por Ribani et al.(2004).

O método de análise possibilitou quantificar de forma eficiente, por multirresíduo, 16 produtos listados na Tabela 4.

As curvas analíticas dos produtos analisados foram construídas a partir das concentrações da solução padrão (pureza acima de 99,8%) de 0,39; 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; e 100,0 ng mL⁻¹.

Tabela 4. Relação de produtos analisados nas amostras de água e de sedimento de fundo dos empreendimentos avaliados.

Análitos Analisados			
Ametrina	Clomazone	Hexazinona	Pendimetalin
Atrazina	Diclosulan	Isoxaflutol	Sulfentrazone
Cafeína	DKN (Diquetonitrila)*	Malation	Sulfometuron
Carbofuran	Fipronil	Metolacoloro	Tebutiuron

*DKN (Diquetonitrila) – metabólito do Isoxaflutol

Na Tabela 5 encontram-se os limites de detecção, de quantificação, a equação de linearidade e o coeficiente de determinação, obtidos após análises das soluções padrões dos agrotóxicos e da cafeína para as águas de afluentes e de tanque de peixes.

Tabela 5. Limites de detecção (ng mL^{-1}) e de quantificação (ng mL^{-1}), equações de linearidade e coeficiente de determinação (R^2), gerados após análise das soluções padrões dos agrotóxicos e da cafeína para as águas coletadas.

Analitos	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Equação de Linearidade	Coefficiente de Determinação (R^2)
Ametrina	0,0098	0,0293	$y = 1,0159x + 0,0184$	0,9951
Atrazina	0,0100	0,0293	$y = 0,9551x + 0,1829$	0,9980
Cafeína	0,0195	0,0585	$y = 1,0672x - 0,2836$	0,9969
Carbofuran	0,0098	0,0293	$y = 0,9789x + 0,0998$	0,9973
Clomazone	0,0783	0,2347	$y = 0,9706x + 0,6078$	0,9894
Diclosulan	0,0098	0,0293	$y = 1,0323x - 0,1640$	0,9961
DKN	0,0783	0,2347	$y = 0,9606x + 0,1559$	0,9954
Fipronil	0,0783	0,2347	$y = 1,0552x - 0,5302$	0,9953
Hexazinona	0,0098	0,0293	$y = 1,0404x - 0,1561$	0,9992
Isoxaflutol	0,0098	0,0293	$y = 1,0401x - 0,2572$	0,9967
Malathion	0,0783	0,2347	$y = 0,9865x + 0,2283$	0,9956
Metolaclor	0,0195	0,0585	$y = 0,9931x + 0,1278$	0,9933
Pendimethalin	0,0783	0,2347	$y = 1,0034x + 0,1018$	0,9883
Sulfentrazone	0,0780	0,2347	$y = 0,9346x + 0,6279$	0,9966
Sulfometuron	0,0098	0,0293	$y = 1,0155x - 0,1273$	0,9960
Tebutiuron	0,0098	0,0293	$y = 1,0009x + 0,0397$	0,9934

Para as amostras de sedimento de fundo, os limites de detecção, de quantificação, a equação de linearidade e o coeficiente de determinação (R^2), obtidos após análises das soluções padrões dos agrotóxicos e da cafeína, encontram-se na Tabela 6.

Para a detecção dos agrotóxicos e da cafeína, as amostras de água foram descongeladas em temperatura ambiente, agitadas manualmente e submetidas à filtração. Alíquotas de 40,0 mL das amostras foram filtradas em uma membrana de fibra de vidro de 47,0 mm e porosidade 0,45 μm com o auxílio de uma bomba a vácuo. O filtrado foi acondicionado em frascos de plástico, para posterior processo de concentração.

A concentração dos analitos foi realizada por meio da técnica de extração líquido-sólido (SPE). Para a concentração dos analitos, um volume de 40,0 mL das amostras de água de afluentes e de tanque, filtrada de acordo com o procedimento descrito acima, foi eluído em um cartucho de C_{18} .

Tabela 6. Limites de detecção (ng mL^{-1}) e de quantificação (ng mL^{-1}), equações de linearidade e coeficiente de determinação (R^2), gerados após análise das soluções padrões dos agrotóxicos e da cafeína para o sedimento de fundo.

Analitos	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Equação de Linearidade	Coefficiente de Determinação (R^2)
Ametrina	0,3910	1,1730	$y = 1,0159x + 0,0184$	0,9951
Atrazina	0,3910	1,1730	$y = 0,9551x + 0,1829$	0,9980
Cafeína	0,7810	2,3430	$y = 1,0672x - 0,2836$	0,9969
Carbofuran	0,3910	1,1730	$y = 0,9789x + 0,0998$	0,9973
Clomazone	3,1300	9,3900	$y = 0,9706x + 0,6078$	0,9894
Diclosulan	0,3910	1,1730	$y = 1,0323x - 0,1640$	0,9961
DKN	3,1300	9,3900	$y = 0,9606x + 0,1559$	0,9954
Fipronil	3,1300	9,3900	$y = 1,0552x - 0,5302$	0,9953
Hexazinona	0,0978	0,2932	$y = 1,0404x - 0,1561$	0,9992
Isoxaflutol	0,3910	1,1730	$y = 1,0401x - 0,2572$	0,9967
Malathion	3,1300	9,3900	$y = 0,9865x + 0,2283$	0,9956
Metolaclor	0,7810	2,3430	$y = 0,9931x + 0,1278$	0,9933
Pendimethalin	3,1300	9,3900	$y = 1,0034x + 0,1018$	0,9883
Sulfentrazone	3,1300	9,3900	$y = 0,9346x + 0,6279$	0,9966
Sulfometuron	0,3910	1,1730	$y = 1,0155x - 0,1273$	0,9960
Tebuturon	0,0978	0,2932	$y = 1,0009x + 0,0397$	0,9934

As etapas envolvidas nesse processo foram: condicionamento da coluna C₁₈ com metanol e água desionizada; eluição das amostras/sorção dos analitos no adsorvente; eluição dos analitos retidos no adsorvente com metanol (2,5 mL) e posterior concentração do composto de interesse, de acordo com o procedimento estabelecido por Kouzayha et al. (2012).

As amostras concentradas foram filtradas com seringas descartáveis e filtros Millex HV (Millipore) 0,45 μm , com membrana durapore 13,0 mm e acondicionadas em *vial* âmbar (*Flow Supply*) para posterior quantificação dos compostos por LC-MS/MS.

Os estudos de recuperação foram realizados com o objetivo de avaliar a porcentagem do analito recuperado após o procedimento de concentração das amostras. A concentração utilizada no teste de recuperação foi 0,1 ng mL^{-1} e os valores do coeficiente de recuperação variaram entre 72,3% e 98,8%, e os respectivos desvios padrões, entre 1,2 e 6,9 (Tabela 7).

Adotou-se como parâmetro ideal percentuais de recuperação entre 70,0 e 120,0% e valores de desvio padrão (D.P.) $\leq 10,0\%$ (Pihlström, 2011).

Tabela 7. Porcentagem de recuperação dos agrotóxicos para a concentração de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ e seus respectivos desvios padrões.

Analitos	Coefficiente de Recuperação (%)	Desvio Padrão do Coeficiente de Recuperação (%)
Ametrina	81,31	4,57
Atrazina	92,19	6,47
Cafeína	72,38	4,45
Carbofuran	98,19	5,23
Clomazone	85,88	6,93
Diclosulan	96,00	3,10
DKN (Diquetonitrila)	77,50	2,85
Fipronil	94,88	4,23
Hexazinona	98,88	2,79
Isoxaflutol	96,64	2,23
Malation	98,50	2,80
Metolaclo	96,56	3,24
Pendimetalin	98,50	1,28
Sulfentrazone	95,69	2,43
Sulfometuron	98,13	3,43
Tebutiuron	98,69	4,97

Para as amostras de sedimento de fundo, aproximadamente 25,0 mL de sedimento úmido foi acondicionado em tubos Falcon de 50,0 mL. Em seguida foram congelados em freezer a -80°C e liofilizadas por 48 horas.

Após a liofilização, amostras com 7,0 g de sedimento de fundo foram acondicionadas em cartuchos plásticos, com uma pastilha porosa e compartimento para coleta da solução do sedimento. Em seguida foi adicionada a amostra 3,0 mL de água desionizada, permanecendo em repouso por 24 horas, sem agitação. Após esse período, os cartuchos foram centrifugados a 4.000,0 rpm, a 25°C por 10,0 minutos para a separação da solução (Carbonari, 2009).

O sobrenadante foi coletado e filtrado com seringas descartáveis e filtros Millex HV (Millipore) $0,45 \mu\text{m}$, com membrana durapore 13,0 mm. O filtrado foi acondicionado em *vial* âmbar (*Flow Supply*) para posterior quantificação dos compostos por LC-MS/MS.

Os valores de tempo de retenção, massa molecular dos analitos e os íons secundários (fragmentos) gerados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Tempo de retenção (minutos), massa molecular dos analitos (g mol^{-1}) e íons secundários (fragmentos) gerados.

Analitos	Tempo de Retenção (T.R.)	Massa Molecular [M-H] ⁺	Íons Secundários		
Ametrina	8,58	228,13	186,1	68,1	96,2
Atrazina	8,85	216,24	174,2	68,1	104,1
Cafeína	5,91	195,22	138,1	110,2	83,2
Carbofuran	8,03	222,11	123,1	77,1	55,1
Clomazone	9,17	240,20	125,1	89,1	99,1
Diclosulan	8,37	405,94	160,9	90,2	125,1
DKN (Diquetonitrila)	15,03	360,05	69,2	125,1	144,3
Fipronil	9,54	436,91	368,0	251,1	263,1
Hexazinona	8,30	253,30	171,2	71,2	85,2
Isoxaflutol	8,69	360,05	251,2	220,2	144,0
Malation	9,37	331,01	99,0	127,1	125,0
Metolaclo	9,79	284,21	252,3	176,2	91,1
Pendimetalin	11,06	282,21	212,2	194,2	118,1
Sulfentrazone	8,10	386,95	110,2	146,1	273,1
Sulfometuron	8,02	365,08	150,2	107,1	67,2
Tebutiuron	8,27	229,25	172,3	116,1	62,0

4.6. Quantificação de cátions

A determinação dos cátions Cobre, Ferro, Manganês, Magnésio, Sódio, Cálcio, Zinco e Potássio nas amostras de água de afluentes e de tanque dos pesque-pague foram realizadas por Espectrofotometria de Absorção e Emissão Atômica com Chamas.

O equipamento utilizado foi o da marca GBC, modelo GBC 932 AA, com lâmpadas de cátodo oco, e chama de gás acetileno oxidante e ar sintético.

Para as análises, 50,0 mL das amostras de água coletadas foram agitadas e filtradas em papel filtro quantitativo da marca Nalgon, diâmetro 15,0 cm, gramatura 80,0 g/m^2 e porosidade 7,5 micras. O filtrado foi acondicionado em tubos Falcon de capacidade de 50,0 mL para posterior determinação.

Na leitura dos elementos Ca e Mg, para minimizar as interferências químicas, foram adicionados 2,5 mL de solução estoque de óxido de lantânio (La_2O_3) nas amostras dos filtrados e nos padrões analíticos. O preparo da solução estoque de óxido de lantânio seguiu o procedimento estabelecido na norma ABNT NBR 13811 (1997).

Na Tabela 9 estão apresentados os parâmetros e as condições de análise dos cátions nas águas de afluentes e de tanque coletadas dos pesque-pague.

Tabela 9. Parâmetros e condições do Espectrômetro de Absorção Atômica em Chamas para análises dos cátions nas águas de afluentes e de tanque coletadas dos pesque-pague.

Elementos	Corrente (mA)	Comprimento de Onda (nm)	Fenda Espectral (nm)
Cu	10,0	324,7	0,5
Fe	10,0	248,3	0,2
Mn	8,0	279,5	0,2
Mg	5,0	285,2	0,5
Na	5,0	589,0	0,5
Ca	5,0	422,7	0,5
Zn	5,0	213,9	0,5
K	5,0	766,5	0,5

As curvas analíticas foram construídas com as soluções padrões dos elementos nas seguintes concentrações:

- **Cu, K, Mg, Mn e Zn** = 0,125; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- **Fe e Na** = 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- **Ca** = 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Na Tabela 10, encontram-se os coeficientes de determinação para cada elemento analisado.

Tabela 10. Coeficiente de determinação (R^2) gerado após análise das soluções padrões dos cátions avaliados nas amostras de água coletadas.

Elementos	Coeficiente de Determinação (R^2)
Cu	0,999
Fe	0,994
Mn	0,999
Mg	1,000
Na	0,999
Ca	0,952
Zn	0,994
K	0,996

4.7. Quantificação de ânions

Os ânions cloreto, nitrito, nitrato, sulfato e fosfato, foram analisados nas amostras de água de afluente e de tanque dos pesque-pague. A quantificação dos ânions foi realizada por cromatografia de íons, segundo o método descrito por Rice et al. (2012).

Antes das quantificações dos ânions, as amostras de água, *in natura*, foram filtradas com seringas descartáveis e filtros Millex HV (Millipore) 0,45 μm , com membrana durapore 13,0 mm. O filtrado foi acondicionado em frasco âmbar (*Flow Supply*) para posterior quantificação.

A coluna cromatográfica utilizada para a corrida foi a DIONEX IONPAC AS11, de dimensões 4,0 x 250,0 mm, na vazão de 2,0 mL min^{-1} e volume aplicado de 100,0 μL .

O sistema cromatográfico adotado foi composto por duas fases móveis de água e hidróxido de potássio. O modo gradiente inicial foi de 1,0 mM de KOH, atingiu aos treze minutos 5,0 mM e aos 23,0 minutos 38,25 mM, e retornou à condição inicial aos 25,0 minutos. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 31,0 minutos.

Os tempos de retenção foram de 1,76 min. para o ânion cloreto; 1,94 min. para o nitrito; 2,68 min. para o nitrato; 7,13 min. para o sulfato; e 11,63 min. para o fosfato.

As concentrações para a construção das curvas analíticas foram obtidas a partir de soluções padrões com pureza acima de 99,8%. As curvas analíticas dos elementos cloreto, nitrito, nitrato, sulfato e fosfato foram realizadas com as concentrações de: 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹.

Na Tabela 11 se encontram os coeficientes de determinação, equações de linearidade, limites de detecção e de quantificação para cada elemento analisado.

Tabela 11. Limites de detecção (mg L⁻¹) e quantificação (mg L⁻¹), equação de linearidade e coeficiente de determinação gerado após análise das soluções padrões dos ânions.

	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Equação de linearidade	Coeficiente de Determinação (R ²)
Cloreto	0,0102	0,0310	y = 1,9438x + 0,0034	0,9998
Nitrito	0,0014	0,0043	y = 2,8141x - 0,0326	0,9977
Nitrato	0,0033	0,0101	y = 3,5749x - 0,0251	0,9992
Sulfato	0,0020	0,0060	y = 3,4478x - 0,0477	0,9966
Fosfato	0,0040	0,0123	y = 7,5083x - 0,0080	0,9997

4.8. Ensaio ecotoxicológico das águas coletadas dos pesque-pague para os organismos bioindicadores *Daphnia magna* e *Lemna minor*

A toxicidade das águas foi avaliada com a utilização dos organismos bioindicadores *D. magna* e *L. minor*. Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados de acordo com os procedimentos estabelecidos nas normas ABNT NBR 12713 (2009) para *D. magna* e OECD 221 (2002), para *L. minor*.

Os ensaios de toxicidade foram conduzidos em salas climatizadas do Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal/SP.

Os exemplares de *D. magna* e de *L. minor* utilizados nos ensaios foram obtidos a partir de cultivos mantidos em laboratório, de acordo com as normas citadas acima.

Durante o período do estudo foram realizados ensaios de sensibilidade para complementar à carta controle de sanidade e sensibilidade dos organismos. A substância de referência utilizada nos ensaios de sensibilidade da *D. magna* e *L. minor* foi o cloreto de sódio (NaCl), de acordo com a norma OECD 221 (2002) e ABNT NBR 12713 (2009).

4.8.1. *Daphnia magna*

Os testes de avaliação da toxicidade aguda das águas dos pesque-pague para *D. magna* compreenderam-se de três ensaios com quatro repetições cada diluição, em recipientes de vidro de 20,0 mL e com 10 mL total das águas e ou meio de cultivo.

As amostras de água foram descongeladas em temperatura ambiente apenas no momento da realização dos ensaios. Os ensaios foram instalados após a temperatura das águas das amostras atingirem a temperatura ambiente da sala climatizada ($20^{\circ}\text{C}\pm 2$) (ABNT NBR 12713, 2009).

As diluições das águas de afluente e de tanque de peixes avaliadas nos ensaios foram 100,0% do efluente coletado e diluições de 3,1%, 6,2%, 12,5%, 25,0% e 50,0% das águas coletadas na água do meio de cultivo das daphnias. Um tratamento controle com apenas o meio de cultivo foi acrescentado em cada ensaio (ABNT NBR 12713, 2009).

Os ensaios foram conduzidos em sistema estático de exposição dos organismos às amostras. Em cada unidade experimental foram adicionados cinco neonatos de *D. magna* com períodos de vida entre 2 e 26 horas (ABNT NBR 12713, 2009).

O tempo de exposição dos organismos foi de 48 horas, em sala climatizada à temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ambiente escuro e sem alimentação dos organismos. O critério de aceitação dos ensaios foi a porcentagem de imobilidade/mortalidade dos organismos nos recipientes controles menor que 10,0% (ABNT NBR 12713, 2009). Após o período de exposição de 48 horas foi realizada a avaliação da imobilidade/mortalidade dos organismos em todos os recipientes que compunham os ensaios.

A imobilidade/mortalidade avaliada foi analisada estatisticamente por meio dos cálculos da média aritmética e do desvio padrão dos três ensaios realizados (ver item 4.10).

Com os resultados dos ensaios, as águas foram classificadas em “tóxicas” - quando a porcentagem de imobilidade/mortalidade foi significativamente maior que no controle (100,0% de água de cultivo) ou “não tóxicas” - quando não houve diferenças significativas com o tratamento controle (ABNT NBR 12713, 2009).

4.8.2. *Lemna minor*

A avaliação da toxicidade das águas coletadas nos pesque-pague para a *L. minor* foi realizada por meio de três ensaios com quatro repetições cada diluição, em recipientes de vidro de volume de 150,0 mL.

As amostras das águas coletadas foram descongeladas em temperatura ambiente apenas no momento da realização dos ensaios. Os ensaios foram instalados após a temperatura das águas das amostras atingirem a temperatura ambiente da sala climatizada ($24^{\circ}\text{C}\pm 2$) (OECD 221, 2002).

As diluições das águas de afluentes e de tanque de peixes avaliadas nos ensaios foram 100,0% do efluente coletado e diluições de 3,1%, 6,2%, 12,5%, 25,0% e 50,0% das águas amostradas no meio de cultivo das lemnas. Um controle com apenas o meio de cultivo foi acrescentado em cada ensaio (OECD 221, 2002). Cada unidade experimental continha quatro colônias de 3,0 frondes cada, totalizando 12,0 frondes.

Os ensaios foram realizados em sistema estático de exposição das macrófitas aquáticas às amostras por sete 07 dias, em sala climatizada à temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com luminosidade entorno de 6.500,0 lux e fotoperíodo de 12 horas (OECD 221, 2002).

O critério de aceitação dos ensaios foi o tempo de duplicação do número de frondes no controle de 2,5 dias (60 horas) (OECD 221, 2002).

A avaliação do ensaio foi realizada no 3^o, 5^o e 7^o dias de exposição por meio da contagem do número de frondes formadas. Nesses dias de avaliação também

foram registrados os parâmetros físicos e químicos das águas; temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) e condutividade elétrica (μS cm⁻¹) de cada recipiente-teste com uma sonda multi paramétrica, modelo YSI 556 MPS.

Os parâmetros avaliados (crescimento de frondes de *L. minor* e características físicas e químicas das águas nos recipientes-teste) foram analisados estaticamente por meio do cálculo da média aritmética e o respectivo desvio padrão dos três ensaios realizados (ver item 4.10).

Com os dados médios do número de frondes foram calculadas a taxa de crescimento específica (equação 01) e a respectiva porcentagem de inibição da taxa de crescimento específica (equação 02), de acordo com o protocolo da norma OECD 221 (2002).

$$\mu_{i-f} = \frac{\ln N_f - \ln N_i}{t_f - t_i} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

μ_{i-f} é a taxa de crescimento específico do início do ensaio (i) até ao final (f);
 N_i e N_f correspondem ao parâmetro medido para as diferentes concentrações testadas ou para o controle no tempo i e f, respectivamente;
 t é o período de tempo desde i até f.

A porcentagem de inibição da taxa de crescimento específico foi calculada com a fórmula seguinte:

$$\%Ir = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

$\%Ir$ é a porcentagem de inibição da taxa de crescimento específico;
 μ_c é o valor médio de μ no controle e μ_T é o valor médio de μ no grupo de tratamento (corresponde às diferentes concentrações testadas).

4.9. Toxicidade do tebutiuron e da cafeína para os organismos *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Oreochromis niloticus*.

Os ensaios ecotoxicológicos de avaliação da toxicidade do tebutiuron e da cafeína foram realizados com os organismos bioindicadores *L. minor*, *D. magna* e *O. niloticus*. Os procedimentos utilizados nos ensaios foram os estabelecidos nas normas OECD 221 (2002) para *L. minor*, ABNT NBR 12713 (2009) para *D. magna* e ABNT NBR 15499 (2015) para *O. niloticus*.

Os ensaios foram conduzidos em salas climatizadas do Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal/SP.

Os exemplares de *D. magna* e de *L. minor* foram obtidos a partir de cultivos mantidos em laboratório, de acordo com as normas citadas. Exemplares de *O. niloticus* foram obtidos pelo Centro de Aquicultura (CAUNESP), UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Inicialmente os exemplares de *O. niloticus* foram aclimatados por 20 dias em caixas d'água de capacidade de 250,0 L com renovação de água e aeração constante, mantidas dentro da sala climatizada. A alimentação dos alevinos foi realizada diariamente com ração balanceada e vitaminada, em pó, com 50,0% de proteína, assim como a limpeza de detritos no fundo do tanque de aclimação.

Ensaio de sensibilidade com a substância de referência foram conduzidos durante o período de realização dos ensaios de avaliação da toxicidade para compor a carta controle de sanidade e sensibilidade dos organismos-teste.

A substância de referência utilizada nos ensaios com a *D. magna* e a *L. minor* foi o cloreto de sódio (NaCl), de acordo com as normas OECD 221 (OECD, 2002); ABNT 12713 (ABNT, 2009). A substância de referência para o peixe *O. niloticus* foi o cloreto de potássio (KCl), de acordo com a norma ABNT 15499 (ABNT, 2015).

Ensaio preliminares foram conduzidos para se determinar os intervalos de concentrações letais ou inibitórios de tebutiuron e cafeína, correspondente à menor concentração que causa 100,0% de mortalidade ou inibição dos

organismos-teste e a maior concentração que não causa mortalidade ou inibição dos organismos-teste.

As concentrações dos ensaios definitivos foram estabelecidas dentro do intervalo de concentrações de letais determinados nos ensaios preliminares.

Os ensaios de sensibilidade dos organismos foram conduzidos nas mesmas condições laboratoriais em que foram realizados os ensaios preliminares e definitivos. Todos os ensaios (sensibilidade, preliminares e definitivos) foram realizados em triplicatas e com três repetições de cada concentração testada e de um tratamento controle, com apenas o meio de cultivo (OECD 221, 2002; ABNT 12713, 2009; ABNT 15499, 2015).

Nos ensaios definitivos, as concentrações de tebutiuron testadas foram:

- ***D. magna*** = 0,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0 e 400,0 mg L⁻¹.
- ***L. minor*** = 0,0; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹.
- ***O. niloticus*** = 0,0; 20,0; 22,0; 24,0; 26,0 e 28,0 mg L⁻¹.

Para a cafeína, as concentrações testadas foram:

- ***D. magna*** = 0,0; 50,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0 e 350,0 mg L⁻¹.
- ***L. minor*** = 0,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 e 300,0 mg L⁻¹.
- ***O. niloticus*** = 0,0; 170,0; 190,0; 210,0; 230,0 e 250,0 mg L⁻¹.

Nos ensaios com a *D. magna* foram utilizados recipientes de vidro de capacidade de 20,0 mL. As unidades experimentais foram compostas com 10,0 mL da solução teste e cinco organismos-teste neonatos, com 2 a 26 horas de vida. O período de exposição foi de 48 horas em sistema estático, no escuro, a 20±2°C e sem alimentação dos organismos (ABNT 12713, 2009).

Após 48 horas de exposição foi avaliada a imobilidade/mortalidade dos organismos em cada unidade experimental. A partir do método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1997), foram calculadas as concentrações efetivas medianas CE_{50-48h} e as faixas de segurança descrita pelo limite inferior e limite superior (LI e LS, p=0,05).

Para *L. minor*, os recipientes utilizados foram de vidro com capacidade de 150,0 mL. As unidades experimentais foram compostas com 100,0 mL da solução

teste. Para a aclimação dos organismos-teste 24 horas antes da diluição do tebutiuron e da cafeína, as 12,0 frondes de *L. minor* foram adicionadas nas unidades experimentais com apenas 50,0 mL de meio de cultivo. Após a aclimação, os produtos testados foram diluídos nos 50,0 mL restantes dos meios de cultivo para conter concentração final de cada tratamento nas unidades experimentais.

O período de exposição foi de sete dias em sistema estático, com fotoperíodo de 16 horas, luminosidade entorno de 6.500,0 lux e temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ (OECD 221, 2002).

No 3º, 5º e 7º dias de exposição foi realizada a avaliação da inibição de crescimento dos organismos por meio da contagem do número de frondes vivas. Ao final do período experimental foi registrado o número total de frondes formadas. Com os valores do número de frondes formadas nas concentrações testadas foram calculados os valores de concentração inibitória mediana (CI_{50-7d}) e dos limites inferior e superior (LI e LS, $p=0,05$) por meio do programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1997).

Os ensaios de toxicidade com *O. niloticus*, foram realizados com organismos-teste de peso corpóreo entorno de 1,0 g. Os peixes foram expostos aos produtos avaliados, em sistema estático, por 48 horas e sem alimentação. As parcelas experimentais utilizadas foram recipientes de vidro com capacidade de 5,0 L e o volume final total de 3,0 L da solução teste. Os ensaios foram conduzidos em sala climatizada com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ (ABNT 15499, 2015).

A aclimação dos peixes nos recipientes experimentais foi realizada com a adição de 2,0 L de água e 3,0 animais, 24 horas antes da aplicação dos produtos testados. Após as 24 horas de aclimação foram adicionou-se 1,0 L de solução teste com as respectivas concentrações dos produtos, para completar o volume final de 3,0 L.

Os animais mortos nos recipientes experimentais foram retirados diariamente e ao final do período experimental foi registrado o número total de animais mortos. Com os valores de mortalidade nas concentrações testadas, foram calculadas a concentração letal mediana (CL_{50-48h}) e o limite inferior e

superior (LI e LS, $p=0,05$) por meio do programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1997).

Todos os procedimentos dos resíduos gerados nesta pesquisa foram descartados de acordo com a Resolução Conama nº430. Em acordo com esta Resolução, “os efluentes de qualquer fonte poluidora somente podem ser lançados diretamente no corpo receptor se estiverem nas condições e padrões estabelecidos com as Normas que preconiza”.

Assim, os resíduos líquidos gerados no processo experimental foram armazenados em tambores plásticos resistentes, de capacidade de 40,0 L, devidamente identificados, para posterior tratamento de acordo com as normas do programa de gerenciamento de resíduos da FCAV/UNESP.

Os organismos-teste utilizados nos ensaios foram congelados para posterior incineração e tratados como resíduo sólido, atendendo as normas do programa de gerenciamento de resíduos da FCAV/UNESP.

4.9.1. Classificação do tebutiuron e cafeína quanto à toxicidade aguda

Os valores de 50% de mortalidade ou inibição calculados nos ensaios de toxicidade para os organismos *D. magna* (CE_{50-48h}), *L. minor* (CI_{50-7d}) e *O. niloticus* (CL_{50-48h}) foram utilizados para classificar o herbicida tebutiuron e a cafeína nas classes de toxicidade aguda propostas por Zucker (1985) e estabelecidas no sistema de classificação de substâncias tóxicas pelo Potencial de Periculosidade Ambiental do IBAMA (2015), que estão contidas na Tabela 12.

Tabela 12. Classes de toxicidade aguda proposta por Zucker (1985) e Sistema de Classificação quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental (IBAMA, 2015) dos contaminantes prevalentes para *D. magna*, *L. minor* e *O. niloticus*.

	CE_{50}, CI_{50} ou CL_{50} ($mg L^{-1}$)	Classes Toxicológicas
Zucker (1985)	$CE_{50}/CI_{50} /CL_{50} < 0,1$	Extremamente tóxico
	$0,1 < CE_{50}/CI_{50} /CL_{50} < 1,0$	Altamente tóxico
	$1,0 < CE_{50}/CI_{50} /CL_{50} < 10,0$	Moderadamente tóxico
	$10,0 < CE_{50}/CI_{50} /CL_{50} < 100,0$	Ligeiramente tóxico
	$CE_{50}/CI_{50} /CL_{50} > 100,0$	Praticamente não tóxico
IBAMA (2015)	$0,0 \leq CE_{50}/CI_{50} /CL_{50} < 1,0$	Altamente tóxico
	$1,0 \leq CE_{50}/CI_{50} /CL_{50} < 10,0$	Muito tóxico
	$10,0 \leq CE_{50}/CI_{50} /CL_{50} < 100,0$	Medianamente tóxico
	$CE_{50}/CI_{50} /CL_{50} \geq 100,0$	Pouco tóxico

4.9.2. Risco de intoxicação ambiental do herbicida tebutiuron para os organismos *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Oreochromis niloticus*.

O herbicida tebutiuron, com base nos valores calculados de toxicidade para os organismos, foi classificado nas classes de risco de intoxicação ambiental citadas por Goktepe et al. (2004). Essa classificação não foi possível de ser realizada para o produto cafeína, uma vez que, não existe atualmente legislação que dite os limites de concentração máxima permitida para o ambiente aquático.

O cálculo do risco de intoxicação ambiental foi baseado na relação entre a concentração ambiental estimada (CAE) e os valores de toxicidade para os organismos.

Os valores das CAE foram calculados considerando-se a contaminação de um espelho d'água de 1,0 ha por escoamento superficial com 100,0%, 50,0%, 25,0%, 12,5%, 6,25%, 3,12% e 1,56% da maior dose recomendada do herbicida tebutiuron para a cultura de cana-de-açúcar ($1.200,0 \text{ g i.a ha}^{-1}$), conforme a bula da formulação comercial Combine 500 SC[®].

No cálculo dos valores das CAE foi considerado também a distribuição uniforme do tebutiuron em todo o volume de água do espelho d'água de um hectare ($10.000,0 \text{ m}^2$) (Parker et al. 1995) com as profundidades de 0,30; 1,0 e 2,0 m (Urban e Cook, 1986; Parker, et al., 1995; Solomon, 1996; Moura, 2009;

Manrique et al., 2013). A densidade média da água considerada nos cálculos foi de $1,0 \text{ g cm}^{-3}$.

A justificativa dos autores para os cálculos para a profundidade 0,3 m é que esta é a faixa onde se encontram o zooplâncton e o fitoplâncton, que são organismos da base da cadeia alimentar. Para as profundidades 1,0 e 2,0 m, é porque são recomendadas pela EPA para avaliação de riscos em ambientes aquáticos.

Após o cálculo da CAE, foi calculado o quociente de risco (QR), conforme descrito por Goktepe et al. (2004) (Equação 3).

$$QR = \frac{CAE}{CE_{50} \text{ OU } CI_{50} \text{ OU } CL_{50}} \quad (\text{Eq.3})$$

Onde:

QR = Quociente de risco;

CAE = Concentração ambiental estimada;

CE_{50} , CI_{50} , CL_{50} = Concentrações letais medianas.

Na Tabela 13, estão citadas as classes dos valores de quociente de risco segundo Goktepe et al. (2004) para os organismos aquáticos avaliados.

Tabela 13. Classificação dos valores de quociente de risco (QR) para organismos aquáticos de acordo com os procedimentos estabelecidos por Goktepe et al. (2004).

Quociente de risco	Classes de risco
RQ >0,5	Alto risco
$0,05 < RQ < 0,5$	Médio Risco
$RQ < 0,05$	Baixo risco

4.10. Análise Estatística

A análise estatística dos ensaios ecotoxicológicos com os organismos *L. minor* e *D. magna* foram realizadas de acordo com os procedimentos

estabelecidos pela norma OECD 221 (2002) e ABNT NBR 12713 (2009), respectivamente.

Para as análises estatísticas dos dados utilizou-se o programa estatístico *Assistat 7.7beta*.

O delineamento experimental utilizado nas análises estatísticas dos ensaios foi o inteiramente ao acaso. A existência de diferenças significativas entre os tratamentos e o controle dos ensaios ecotoxicológicos com os organismos *D. magna* e *L. minor* foi verificada por meio da análise de variância (ANOVA). O teste de variância utilizado foi o teste F e, quando o F foi significativo, as médias foram comparadas com teste de comparação de média de Scott-Knott ($p = 0,05$).

Nos ensaios ecotoxicológicos com a *L. minor*, as variáveis condutividade das águas dos recipientes-teste, no sétimo dia de exposição das macrófitas, e a % de inibição de crescimento das frondes do organismo foram analisadas por meio do coeficiente de correlação de Pearson, ao nível de 5,0% de significância.

Para verificar a relação existente entre a declividade média dos relevos das microbacias hidrográficas em que os pesque-pague estão inseridos, a área de mata ciliar de entorno com a rede fluvial das microbacias, as áreas de plantações de cana-de-açúcar e a contaminação das águas dos pesque-pague, os dados foram analisados pelo coeficiente de correlação de Pearson ($p = 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Contaminação das amostras de água por agrotóxicos nos pesque-pague

Nas águas dos cinco pesque-pague, localizados nas regiões administrativas de Ribeirão Preto e Central, no Estado de São Paulo, foi constatada a presença de resíduos de seis dos quinze agrotóxicos analisados (Tabela 4). Estes normalmente são aplicados em culturas de cana-de-açúcar inseridas no entorno dos pesque-pague. Os agrotóxicos encontrados nas águas de afluentes e de tanque de peixes dos pesque-pague foram ametrina, atrazina, clomazone, hexazinona, metolaclo e tebutiuron.

Na Tabela 14 se encontram os valores totais das concentrações (ng mL^{-1}) dos herbicidas encontrados nas águas de afluentes (AA) e tanque de peixes (AT) dos cinco pesque-pague, nas quatro estações do ano entre Junho/2014 e Maio/2015.

O herbicida tebutiuron foi o maior contaminante das águas dos pesque-pague durante o período avaliado, representando um total de contaminação de $2,908 \text{ ng mL}^{-1}$ ao longo do ano de coleta (Tabela 14).

As maiores contaminações das águas com o tebutiuron são devidas às suas características físicas e químicas, que lhe confere elevado potencial de transporte, via enxurrada e lixiviação, do local de aplicação para as bacias fluviais. Dentre essas características, podem-se citar a alta solubilidade na água (2.500 mg L^{-1} a 20°C), meia vida de 400 dias, baixo coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e coeficiente de sorção (K_{oc}) e pressão de vapor a 25°C de $0,27 \text{ mPa}$ (Rodrigues e Almeida, 2005; Christoffoleti et al., 2008; UH, 2016).

De acordo com o índice de vulnerabilidade de águas subterrâneas (GUS), o herbicida tebutiuron é classificado como lixiviável ($\text{GUS} > 2,8$); indicativo de alta percolação no solo e contaminação das águas subterrâneas. Pelo índice de contaminação das águas superficiais (GOSS), devido aos seus altos valores de meia vida e solubilidade em água e ao baixo K_{oc} , o tebutiuron é classificado como

de alto potencial de transporte dissolvido em água (Armas et al., 2005; Milhorne et al., 2009; Britto et al., 2012; UH, 2016).

Tabela 14. Valores totais das concentrações (ng mL⁻¹) dos herbicidas detectados nas águas de afluente (AA) e de tanque de peixes (AT) para os cinco pesque-pague, nos quatro períodos de amostragens, compreendidos entre Maio/2014 e Junho/2015.

Afluente								
Períodos de Amostragens	Pesque-Pague	Herbicidas					Total	
		Tebutiuron	Metolacoloro	Hexazinona	Clomazone	Ametrina		Atrazina
Primavera	A	0,006	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,023
	B	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008
	C	0,146	0,016	0,075	0,000	0,047	0,000	0,284
	D	0,027	0,031	0,009	0,000	0,029	0,000	0,096
	E	0,200	0,047	0,015	0,129	0,028	0,000	0,419
Verão	A	0,003	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022
	B	0,015	0,013	0,012	0,000	0,029	0,037	0,106
	C	0,214	0,036	0,052	0,155	0,060	0,036	0,553
	D	0,038	0,136	0,009	0,000	0,030	0,066	0,279
	E	0,109	0,000	0,016	0,000	0,025	0,053	0,203
Outono	A	0,000	0,015	0,000	0,130	0,000	0,000	0,145
	B	0,011	0,013	0,000	0,000	0,026	0,027	0,077
	C	0,175	0,020	0,078	0,000	0,061	0,075	0,409
	D	0,054	0,056	0,010	0,000	0,034	0,260	0,414
	E	0,133	0,000	0,016	0,000	0,030	0,081	0,260
Inverno	A	0,006	0,038	0,003	0,177	0,000	0,000	0,224
	B	0,014	0,024	0,038	0,000	0,000	0,000	0,076
	C	0,202	0,015	0,108	0,000	0,064	0,000	0,389
	D	0,014	0,014	0,011	0,000	0,026	0,000	0,065
	E	0,056	0,000	0,004	0,128	0,000	0,000	0,188
Total		1,431	0,510	0,456	0,719	0,489	0,635	

Água de Tanque								
Períodos de Amostragens	Pesque-Pague	Herbicidas					Total	
		Tebutiuron	Metolacoloro	Hexazinona	Clomazone	Ametrina		Atrazina
Primavera	A	0,019	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033
	B	0,009	0,021	0,000	0,139	0,032	0,021	0,222
	C	0,291	0,053	0,081	0,000	0,127	0,029	0,581
	D	0,033	0,231	0,024	0,000	0,031	0,000	0,319
	E	0,213	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,219
Verão	A	0,006	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032
	B	0,006	0,023	0,000	0,000	0,000	0,020	0,049
	C	0,232	0,048	0,124	0,000	0,131	0,049	0,584
	D	0,025	0,125	0,016	0,000	0,031	0,203	0,400
	E	0,093	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,101
Outono	A	0,010	0,013	0,000	0,000	0,000	0,021	0,044
	B	0,170	0,028	0,128	0,000	0,109	0,000	0,435
	C	0,023	0,038	0,113	0,000	0,000	0,000	0,174
	D	0,197	0,000	0,022	0,000	0,000	0,030	0,249
	E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Inverno	A	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006
	B	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008
	C	0,055	0,020	0,020	0,000	0,027	0,000	0,122
	D	0,023	0,029	0,038	0,000	0,027	0,000	0,117
	E	0,058	0,032	0,029	0,000	0,000	0,000	0,119
Total		1,477	0,701	0,609	0,139	0,515	0,373	

Gomes et al. (2001) confirmaram o alto potencial de risco do tebutiuron de contaminar as águas subterrâneas da microbacia do Córrego Espreado, na região de Ribeirão Preto em um monitoramento por um período de quatro anos. Esses autores constataram a presença de tebutiuron em todas as amostras de água analisadas. Pessoa et al. (2003), também na microbacia do Córrego Espreado, verificaram que 13,1% da área de estudo apresentou alta exposição à contaminação de tebutiuron.

Bicalho e Langenbach (2013) demonstraram que o herbicida tebutiuron não é facilmente biodegradado e, por conseguinte, é altamente persistente no ambiente. Essa característica deve-se ao baixo valor de mineralização da molécula ($\leq 0,9\%$).

Em ordem decrescente e na sequência ao tebutiuron, as maiores concentrações foram dos herbicidas metolaclo e hexazinona, com a contaminação total de $1,211 \text{ ng mL}^{-1}$ e $1,065 \text{ ng mL}^{-1}$ respectivamente (Tabela 14).

As contaminações das águas com o metolaclo podem ser explicadas também pelas características físicas e químicas dessa molécula. A alta solubilidade ($530,0 \text{ mg L}^{-1}$ a 20°C), moderada persistência, pressão de vapor de $1,7 \text{ mPa}$ (25°C) e a moderada mobilidade proporcionam alto potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas pelo metolaclo aplicado (UH, 2016).

Pelo índice de vulnerabilidade de águas subterrâneas (GUS), o herbicida metolaclo tem risco potencial de contaminação de águas subterrâneas, uma vez que é classificado como lixiviável ($\text{GUS} > 2,8$). Pelo índice de contaminação das águas superficiais (GOSS), o metolaclo apresenta alto risco de contaminação de águas superficiais por transporte dissolvido em água (Milhome et al., 2009).

Mariot et al. (2009) constataram a alta mobilidade do metolaclo em perfis do solo Latossolo Amarelo distrófico típico cultivado com algodão no município de Primavera do Leste, MT. Nessa mesma região, foram quantificadas concentrações de até $1,732 \text{ ng mL}^{-1}$ de metolaclo em águas subterrâneas (Dores et al., 2008).

Em cultivos de milho no Nordeste da Grécia, Vryzas et al. (2012), constataram lixiviação do herbicida metolaclo de até $110,0 \text{ cm}$ de profundidade

após 50,0 mm de chuva. O metolacloro persistiu na solução do solo, com níveis de concentração de até 10,0 ng mL⁻¹, por 16 meses após a aplicação.

A contaminação de águas superficiais com o metolacloro por escoamento superficial pode ser de até 5,0% da quantidade aplicada (Dores et al., 2009). Portanto, as práticas agrícolas de conservação do solo são fundamentais para se reduzir o transporte e escoamento dos agrotóxicos e evitar a contaminação dos corpos d'água.

O herbicida hexazinona tem grande potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas devido às características físicas e químicas favoráveis da molécula. O hexazinona tem alta solubilidade em água, de 33,0 g L⁻¹ a 25°C, pressão de vapor de 0,03 mPa, baixa adsorção no solo e índice de GUS $\geq 2,8$, portanto lixiviável (Celis et al., 2002; Queiroz et al., 2009; Mendes et al., 2013; UH, 2016).

Devido às características físicas e químicas que potencializam o transporte do hexazinona via lixiviação, esse herbicida tem sido detectado no ambiente aquático e nos perfis do solo. O hexazinona foi detectado na concentração de 260,0 ng mL⁻¹ em águas de poços de abastecimento da cidade de Ribeirão Preto, localizados próximos a plantações de cana-de-açúcar (Di Bernardo Dantas et al., 2011). Dousset et al. (2004) constataram que entre 2,0 a 11,0% do hexazinona aplicado em solos com variados teores de argila e carbono orgânico foram recuperados após 160,0 mm de chuva simulada ao longo de 12 dias.

Os herbicidas atrazina, ametrina e clomazone também foram encontrados nas águas de afluente e de tanque de peixes dos pesque-pague avaliados. A atrazina apresentou um total de contaminação de 1,008 ng mL⁻¹, a ametrina de 1,004 ng mL⁻¹ e o clomazone de 0,858 ng mL⁻¹ (Tabela 14). Os três herbicidas juntos representam 35,6% da contaminação total das águas (Tabela 14).

A presença das triazinas (ametrina e atrazina) nas águas dos pesque-pague é previsível também devido às características físicas e químicas das moléculas, como moderada persistência, mobilidade e solubilidade em água, a fraca capacidade de adsorção e alta volatilidade. Essas características favorecem o transporte dos dois herbicidas por escoamento superficial e lixiviação na água e

deposição atmosférica por volatilização (Gfrerer et al., 2002; Armas et al., 2007; UH, 2016).

Estudos sobre a degradação de atrazina em águas subterrâneas e solos comprovam a persistência desse herbicida, especialmente em águas estagnadas ($T_{1/2} = 206,0$ a $710,0$ dias), devido aos mecanismos naturais não serem suficientes para atenuar os riscos de acúmulo de atrazina ao longo do tempo (Schwab et al., 2006).

Em um estudo da distribuição do herbicida atrazina nos compartimentos ambientais, Correia e Langenbach (2006) observaram que o processo de volatilização foi responsável por 0,3% do transporte do agrotóxico, a mineralização por 0,2% e a lixiviação por 4,0 a 11,0%. Verificaram que, após 90 dias da aplicação no solo, a atrazina, foi encontrada a 50,0 cm de profundidade, e citam ainda que o herbicida atinge as águas do subsolo. Verificaram também que a grande perda de atrazina pelo processo de escoamento superficial foi dissolvida na fase líquida (1,6%); quatro vezes maior que adsorvida às partículas erodidas do solo (0,4%).

Os herbicidas atrazina e ametrina aplicados em Latossolo Vermelho Amarelo podem atingir os lençóis freáticos devido à mobilidade no perfil do solo, mas a ametrina tem maior potencial de contaminação do ambiente, devido às maiores meia vida, persistência e mobilidade da molécula no solo, em relação à atrazina (Paula, 2007).

O herbicida clomazone tem grande potencial de deslocamento no ambiente devido à alta solubilidade da molécula em água a 20°C ($1,1 \text{ g L}^{-1}$), elevada volatilidade (pressão de vapor de $19,2 \text{ mPa}$ à 25°C), moderada persistência e mobilidade no solo (Noldin et al., 2001; UH, 2016).

O clomazone é um herbicida registrado para a cultura de arroz inundado, e a drenagem das águas, no final do ciclo da cultura, tem alto risco de contaminação de rios e riachos da rede hídrica local, devido à possibilidade de carreamento de resíduos do herbicida (Noldin et al., 2001).

5.2. Influência dos períodos de estiagem e de chuvas na contaminação das águas dos pesque-pague por agrotóxicos

Nos resultados desse estudo foram observadas as relações entre a quantidade de chuva e o transporte de agrotóxicos para as águas dos pesque-pague. As maiores concentrações dos herbicidas nas águas foram observadas no período de amostragem em que ocorreram as maiores precipitações (Tabela 15).

Na região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil a colheita da cana-de-açúcar inicia-se nos meses de abril/maio, e estende-se a novembro/dezembro. No final do período de colheita, ou no início das chuvas, são realizados os tratamentos culturais, incluindo o manejo de plantas daninhas, com a aplicação dos herbicidas (Correia et al., 2010).

Com o início das precipitações, os agrotóxicos podem ser transportados para a rede fluvial local via escoamento superficial ou percolação em direção às águas superficiais e subterrâneas (Britto et al., 2012). Este fato, aliado às características físicas e químicas dos agrotóxicos, que favorecem esse transporte, proporcionam as maiores contaminação das águas coletadas durante o período de chuvas.

Tabela 15. Valores das concentrações (ng mL^{-1}) dos herbicidas detectados nas águas coletadas e as precipitações (mm), durante o período de amostragem de Junho/2014 a Maio/2015, agrupados em épocas de estiagem e de chuvas.

Afluente								
Período de Amostragem	Precipitação (mm)	Herbicidas						Total
		Tebutiuron	Metolacloro	Hexazinona	Clomazone	Ametrina	Atrazina	
Estiagem	308,52	0,679	0,202	0,263	0,434	0,194	0,000	1,772
Chuva	899,54	0,752	0,308	0,193	0,285	0,295	0,635	2,468

Água do Tanque								
Período de Amostragem	Precipitação (mm)	Herbicidas						Total
		Tebutiuron	Metolacloro	Hexazinona	Clomazone	Ametrina	Atrazina	
Estiagem	308,52	0,715	0,400	0,198	0,139	0,244	0,050	1,746
Chuva	899,54	0,762	0,301	0,411	0,000	0,271	0,323	2,068

A influência do período chuvoso na contaminação de águas superficiais também foi detectada por Soares et al. (2013). Os autores encontraram resíduos de agrotóxicos em 67,0% das amostras de água coletadas durante a estação chuvosa, e em 21,0% durante a estação de estiagem.

Sangchan et al. (2014) também constataram a relação entre as estações chuvosa e estiagem e a contaminação de águas superficiais por agrotóxicos. Verificaram que as maiores contaminações das águas superficiais com os agrotóxicos ocorrem durante a estação chuvosa que correspondem de 0,002 a 4,1% das quantidades aplicadas.

As menores contaminações das águas dos pesque-pague ocorreram nos meses correspondentes ao período de estiagem (Tabela 15). No entanto, o herbicida clomazone apresentou maior concentração nas águas durante o período de estiagem ($0,573 \text{ ng mL}^{-1}$) em relação ao período de chuva ($0,285 \text{ ng mL}^{-1}$) (Tabela 15).

A maior contaminação das águas pelo herbicida clomazone no período de estiagem pode ser explicada pelo fato de que esse herbicida é recomendado para ser aplicado em épocas de baixa precipitação.

Essas recomendações são devidas às características físicas e químicas do clomazone, que proporcionam a dessorção para a solução do solo e a disponibilidade de absorção pela radícula e/ou caulículo das plântulas mesmo em condições de baixa umidade do solo (Rodrigues e Almeida, 2005; Procópio et al., 2008; Correia et al., 2010).

5.3. Comparação da contaminação das águas de afluente e de tanque de peixes dos pesque-pague por agrotóxicos.

O total da concentração de herbicidas, em ng mL^{-1} , para as águas de afluente (AA) e águas de tanque (AT) de peixes dos cinco pesque-pague, no período compreendido entre Junho/2014 a Maio/2015, se encontram na Tabela 16.

Todas as amostras das águas dos cinco pesque-pague estavam contaminadas por pelo menos um dos agrotóxicos avaliados. Os afluentes dos pesque-pague estavam mais contaminados do que as águas dos tanques de peixes, exceto nos pesque-pague B e D. Na comparação entre os cinco pesque-pague, as águas do C apresentaram as maiores concentrações de herbicidas.

A soma das concentrações de todos os herbicidas nas águas do afluente (AA) e do tanque de peixes (AT) totalizou, em ordem decrescente (Tabela 16):

- **No C** = 3,096 ng mL⁻¹ (AA = 1,635 ng mL⁻¹ e AT = 1,461 ng mL⁻¹).
- **No D** = 1,939 ng mL⁻¹ (AA = 0,854 ng mL⁻¹ e AT = 1,085 ng mL⁻¹).
- **No E** = 1,509 ng mL⁻¹ (AA = 1,070 ng mL⁻¹ e AT = 0,439 ng mL⁻¹).
- **No B** = 0,981 ng mL⁻¹ (AA = 0,267 ng mL⁻¹ e AT = 0,714 ng mL⁻¹).
- **No A** = 0,529 ng mL⁻¹ (AA = 0,414 ng mL⁻¹ e AT = 0,115 ng mL⁻¹).

Tabela 16. Valores das concentrações dos herbicidas (ng mL⁻¹) nas águas de afluente (AA) e de tanque (AT) para os cinco pesque-pague, no período entre Junho/2014 a Maio/2015.

Pesque-Pague	Ponto de Coleta	Herbicidas						Total
		Tebutiuron	Metolacloro	Hexazinona	Clomazone	Ametrina	Atrazina	
A	AA	0,015	0,089	0,003	0,307	0,000	0,000	0,414
	AT	0,041	0,053	0,000	0,000	0,000	0,021	0,115
B	AA	0,048	0,050	0,050	0,000	0,055	0,064	0,267
	AT	0,193	0,072	0,128	0,139	0,141	0,041	0,714
C	AA	0,737	0,087	0,313	0,155	0,232	0,111	1,635
	AT	0,601	0,159	0,338	0,000	0,285	0,078	1,461
D	AA	0,133	0,237	0,039	0,000	0,119	0,326	0,854
	AT	0,278	0,385	0,100	0,000	0,089	0,233	1,085
E	AA	0,498	0,047	0,051	0,257	0,083	0,134	1,070
	AT	0,364	0,032	0,043	0,000	0,000	0,000	0,439
Ponto de Coleta		Herbicidas						Total
		Tebutiuron	Metolacloro	Hexazinona	Clomazone	Ametrina	Atrazina	
AA		1,431	0,510	0,456	0,719	0,489	0,635	4,240
AT		1,477	0,701	0,609	0,139	0,515	0,373	3,814

A contaminação detectada nas águas dos pesque-pague está relacionada à proximidade com as atividades agrícolas e o tamanho das áreas da microbacia no entorno da rede fluvial cultivada com cana-de-açúcar. Silva (2006) constatou uma relação positiva entre a utilização de agrotóxicos em regiões agrícolas do Norte Fluminense com a baixa qualidade das águas subterrâneas e superficiais dessas regiões.

No entanto, outros fatores devem ser considerados quando se pretende compreender a contaminação de corpos d'água, como: declividade do terreno, a presença de mata ciliar e a área de plantações localizadas próximas aos cursos

d'água. O uso do solo em que a rede fluvial se insere se destaca entre os fatores diretamente relacionados com a contaminação das águas.

A declividade média da microbacia em que se inserem os pesque-pague, a ocupação das áreas por matas ciliares e plantações de cana-de-açúcar e a contaminação das águas de afluentes e de tanques dos pesque-pague podem ser observadas na Tabela 17.

Tabela 17. Porcentagens da declividade média da microbacia em que se inserem os pesque-pague, da mata ciliar ao redor do curso do rio que os abastecem, da área de plantação de cana-de-açúcar e da contaminação de suas águas pelos herbicidas.

	A	B	C	D	E
Declividade Média (%)	1,91	0,48	1,45	0,30	1,24
Área de Mata Ciliar (%)	3,64	5,24	3,16	9,27	9,43
Área de Plantação (%)	96,36	56,35	96,84	90,73	90,57
% de Contaminação das águas	6,57	12,18	38,44	24,07	18,73

Teste de correlação de Pearson (alfa = 5%):

- Declividade x Contaminação: $r = 0,0911^{ns}$

- Mata Ciliar x Contaminação: $r = -0,0390^{ns}$

- Área de Plantação x Contaminação: $r = 0,3690^{ns}$.

ns = não significativo ($p \geq 0.05$)

Pelos valores calculados de r do teste de correlação de Pearson (Tabela 17) verifica-se uma correlação insignificante, de acordo com as classificações de Hinkle et al. (2003), entre as contaminações das águas dos pesque-pague pelos herbicidas com a declividade média das microbacias ($r = 0,0911$) e com a área de mata ciliar no entorno da rede hidrográfica local ($r = -0,0390$).

A inexistente relação entre essas variáveis pode estar relacionada ao relevo plano dos terrenos cultivados com a cultura de cana-de-açúcar nas microbacias dos pesque-pague. As inclinações dos relevos das microbacias dos pesque-pague estão entre 0,30 a 1,91% e são classificadas como relevo plano, de acordo com as classes de declividade adotada no sistema brasileiro de classificação do solo (EMBRAPA, 2006).

A correlação entre a contaminação das águas dos pesque-pague com os herbicidas e a porcentagem de área das microbacias plantada de cana-de-açúcar ($r = 0,3690$) foi positiva, porém baixa e se classifica como não significativa (Hinkle, et al. 2003).

Portanto, os prováveis fatores ambientais locais que influenciaram na contaminação das águas dos pesque-pague foram à quantidade de agrotóxicos aplicados nas plantações e o manejo do solo. Esses fatores podem ter auxiliado nos transportes dos herbicidas, aplicados nas culturas de cana-de-açúcar, em direção aos corpos d'água durante períodos de chuvas via escoamento superficial e lixiviação.

Para os pesque-pague avaliados, exceção ao B e D, a água do tanque estava menos contaminada com herbicidas que as águas dos afluentes (Tabela 16). A contaminação total dos afluentes dos cinco pesque-pague foi de 4,240 ng mL⁻¹ e das águas dos tanques de peixes, de 3,814 ng mL⁻¹.

Nas águas superficiais e subterrâneas na microbacia hidrográfica do Córrego Rico, situado na bacia do Rio Mogi Guaçu, na região Nordeste do Estado de São Paulo foi constatado a contaminação com quinze herbicidas utilizados em cultura de cana-de-açúcar. As águas do córrego estavam mais contaminadas que as águas das lagoas (SANTOS, 2013). Esses dados corroboram com os resultados encontrados nesse trabalho, uma vez que a água do córrego pode ser comparada com afluentes dos pesque-pague e as águas das lagoas com as águas do tanque dos peixes.

No ambiente aquático, os agrotóxicos podem sofrer diferentes processos físicos, químicos e biológicos. Entre esses se destaca a fotólise, volatilização, ressuspensão, sorção, biodegradação e bioacumulação (Figura 16).

Holvoet et al. (2007) destacam os processos sorção/dessorção e biodegradação como fundamentais no destino dos agrotóxicos no ambiente aquático e ainda citam que são diretamente influenciados pelo sedimento de fundo. Esses processos podem explicar a ocorrência das menores concentrações dos herbicidas detectadas nas águas dos tanques de peixes dos pesque-pague, devido aos processos de adsorção das moléculas de agrotóxicos ao sedimento

em suspensão, biodegradação e bioacumulação pelos organismos aquáticos nos tanques.

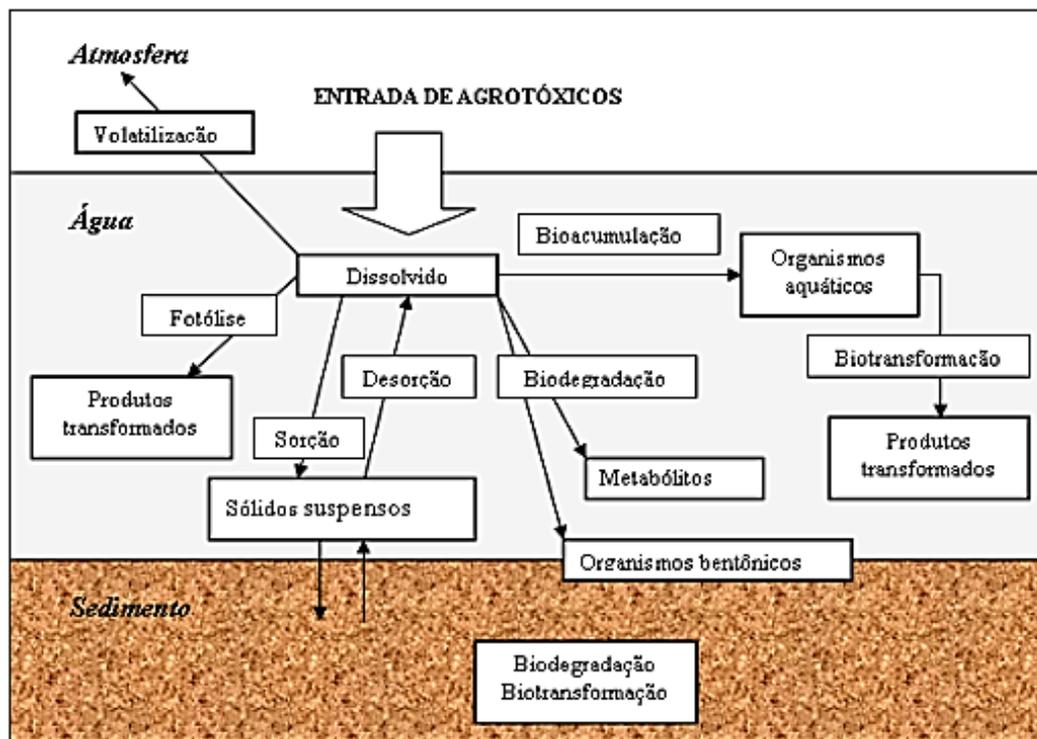


Figura 16. Processos físicos, químicos e microbiológicos que ocorrem com os agrotóxicos quando inseridos nas águas superficiais. Fonte: Holvoet et al. (2007).

5.4. Contaminação dos sedimentos de fundo dos tanques dos pesque-pague por agrotóxicos

Entres as amostras de sedimentos de fundo dos tanques de peixes, 90,0% estavam contaminadas com pelo menos um dos agrotóxicos analisados. Os agrotóxicos detectados nas amostras de sedimentos de fundo dos tanques dos pesque-pague foram, em ordem decrescente, os herbicidas metolacoloro, tebutiuron, hexazinona e o isoxaflutol (Tabela 18).

As maiores concentrações de herbicidas nos sedimentos de fundo ocorreram nos tanques de peixes dos pesque-pague C ($1,114 \text{ ng g}^{-1}$) e A ($1,096 \text{ ng g}^{-1}$). Por outro lado, as menores concentrações de herbicidas ocorreram, em ordem decrescente, nos sedimentos dos pesque-pague D ($0,503 \text{ ng g}^{-1}$), B ($0,446 \text{ ng g}^{-1}$) e E ($0,087 \text{ ng g}^{-1}$) (Tabela 18).

Tabela 18. Concentrações (ng g^{-1}) dos agrotóxicos encontrados nas amostras de sedimento de fundo dos tanques de peixes para os cinco pesque-pague avaliados no período entre Junho/2014 a Maio/2015.

Períodos de Amostragens	Pesque-Pague	Herbicidas				Total
		Tebutiuron	Hexazinona	Metolaclo-ro	Isoxaflutol	
Primavera	A	0,097	0,000	0,000	0,004	0,101
	B	0,000	0,141	0,249	0,000	0,390
	C	0,100	0,000	0,000	0,000	0,100
	D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Verão	A	0,009	0,000	0,365	0,000	0,373
	B	0,000	0,056	0,000	0,000	0,056
	C	0,080	0,000	0,000	0,000	0,080
	D	0,000	0,000	0,232	0,000	0,232
	E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Outono	A	0,000	0,000	0,621	0,000	0,621
	B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	C	0,087	0,000	0,000	0,000	0,087
	D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	E	0,043	0,044	0,000	0,000	0,087
Inverno	A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	C	0,124	0,153	0,570	0,000	0,847
	D	0,000	0,000	0,271	0,000	0,271
	E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Total		0,540	0,394	2,308	0,004	

A composição física dos sedimentos tem uma contribuição relevante na capacidade de adsorção dos mesmos. A alta superfície específica dos minerais de argila ($8 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$) contribui para a capacidade sortiva do solo. Em adição, as partículas de argila possuem uma camada externa de cátions, ligados a uma camada interna eletrostaticamente carregada, o que as tornam susceptíveis a trocas iônicas (Christoffoleti et al., 2008; Melo et al., 2009).

Esses fatores associados ao conteúdo de argila determinam a tendência do solo em reter nutrientes, moléculas orgânicas e água. Além da quantidade, a constituição da fração argila tem importante contribuição na sorção dos agrotóxicos ao solo (Christoffoleti et al., 2008).

A granulometria dos sedimentos de fundo dos pesque-pague classificou-os na classe textural argilosa e as maiores quantidades de argilas ocorreram nos sedimentos de fundo dos pesque-pague A, B, e C (Tabela 3). As menores quantidades de argilas ocorreram nos sedimentos de fundo dos pesque-pague D e E, classificados na classe textural média, devido aos valores expressivos de areia grossa e silte, respectivamente.

Em estudo realizado por Firmino et al. (2008) foi evidenciada a influência da textura argilosa na movimentação de moléculas de agrotóxicos no perfil do solo. Verificaram que a movimentação do herbicida imazapir foi menor em solos de textura argilosa e na camada de 15,0 cm de profundidade, em comparação aos solos de textura areia franca (25,0 cm) e franco-argilo-arenoso (20,0 cm). Os solos com texturas argilosas retêm as maiores concentrações do herbicida sulfentrazone nas camadas superficiais do perfil do solo (Passos, 2011).

Esses trabalhos corroboram os resultados da presente pesquisa, uma vez que, as maiores concentrações dos herbicidas foram encontradas nos sedimentos de fundo mais argiloso, que são os dos pesque-pague C e A.

Esse resultado pode estar associado ao caráter aniônico das moléculas de agrotóxicos detectados, que está diretamente relacionado com a quantidade de pares de elétrons livres de nitrogênio, enxofre e oxigênio (Russel, 1994) (Figura 17).

O maior teor de matéria orgânica ($45,0 \text{ g dm}^{-3}$) no sedimento de fundo ocorreu no pesque-pague E. No entanto, nesse sedimento ocorreu a menor concentração dos herbicidas ($0,087 \text{ ng g}^{-1}$) (Tabela 18). Esse resultado contraditório pode estar relacionado à caracterização física do sedimento desse pesque-pague, uma vez que apresentou maior quantidade de silte ($392,0 \text{ g kg}^{-1}$) em relação à argila.

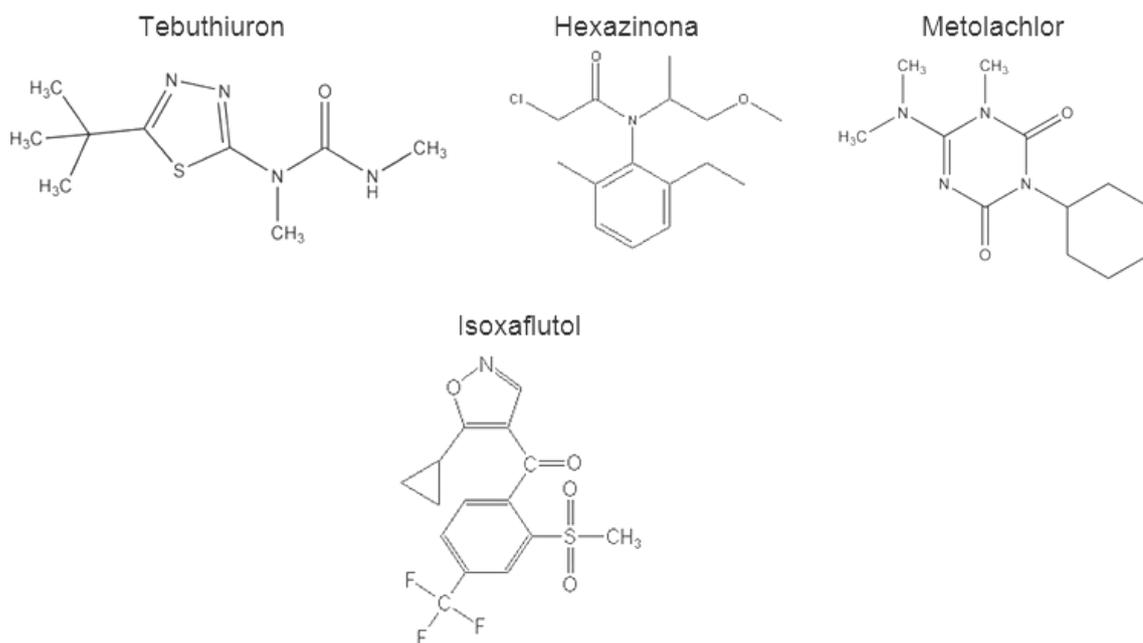


Figura 17. Estruturas moleculares dos herbicidas detectados nas amostras de sedimento de fundo dos pesque-pague avaliados.

A influência não relevante da matéria orgânica no processo de adsorção de herbicidas nos sedimentos de fundo dos pesque-pague pode estar relacionada à natureza da matéria orgânica, que favorece o processo de sorção de moléculas orgânicas, especialmente as apolares (hidrofóbicas) (Christoffoleti et al., 2008; Schreiber, 2012).

Em adição ao potencial de sorção dos agrotóxicos, a matéria orgânica também está relacionada à atividade microbiana, que é mais abundante nas camadas superficiais do sedimento. Os microrganismos atuam na biodegradação dos agrotóxicos, utilizando-os como fonte de energia ou apenas modificando a estrutura química da molécula (Monteiro, 1996).

Em sedimentos alagados, o suprimento de O_2 se torna lento devido à baixa taxa de difusão deste gás na água. O baixo suprimento de O_2 provoca uma mudança na microbiota do sedimento que passa a ser, anaeróbia facultativa e/ou obrigatória. Dessa forma, a decomposição da matéria orgânica se dá por respiração anaeróbia. No entanto, a biodegradação na interface sedimento/água, ocorre por meio das vias de respiração aeróbia e anaeróbia (Sousa et al., 2009).

O processo de biodegradação das moléculas de herbicidas em sedimentos com altos teores de matéria orgânica, em destaque para o pesque-pague E, também foi um provável fator que influenciou nas menores concentrações detectadas desses agrotóxicos nos sedimentos de fundo desse pesque-pague.

A solubilidade das moléculas dos agrotóxicos destaca-se como fator relevante no comportamento ambiental. Para a maioria dos compostos, a solubilidade em água e a adsorção às partículas do sedimento são inversamente correlacionadas (Luís, 2004).

Portanto, se pode relacionar a solubilidade dos herbicidas detectados com os seus baixos valores de adsorção ao sedimento de fundo dos tanques de peixes dos pesque-pague. Dentre os agrotóxicos quantificados, exceção ao isoxaflutol e a atrazina, todos apresentam elevadas solubilidades em água (ver item 5.1).

Um fator físico-químico de importância na capacidade sorviva de agrotóxicos é o pH da solução do solo. O pH provoca mudanças na conformação das moléculas da matéria orgânica, além de alterar o estado de ionização das moléculas de herbicidas iônicos (Traghetta et al. 1996; Christoffoleti et al., 2008; Silva et al., 2012b).

Por apresentarem pares de elétrons livres em suas estruturas moleculares (Figura 17), os herbicidas detectados nas amostras de sedimento de fundo dos tanques dos pesque-pague, de acordo com Gilbert Newton Lewis, são classificados como de caráter básico (Russel, 1994). De acordo com Kogan e Pèrez (2004), quando o pH do solo for inferior ao pKb dos herbicidas de caráter básico, há tendência desses agrotóxicos ficarem sorvidos as partículas de argila e aos grupos funcionais que formam o CTC do solo.

Esse fato também pode ser considerado para explicar a contaminação dos sedimentos de fundo, pois os pKb dos herbicidas detectados nas amostras de sedimento são maiores que o pH dos sedimentos. Os valores de pH dos sedimentos variaram entre 4,5 a 5,4 (Tabela 3) e os classificam entre média a alta acidez (Christoffoleti et al., 2008) e os valores de pKb dos herbicidas de caráter básico variaram entre 9,7 a 14.

5.5. Contaminação das águas de afluente e de tanque de peixes por cafeína

A cafeína foi encontrada nas águas de afluente e de tanque de peixes dos pesque-pague avaliados, cuja contaminação total foi de 5,840 ng mL⁻¹. A concentração total de cafeína no afluente foi de 3,301 ng mL⁻¹ e nas águas dos tanques de peixes, de 2,539 ng mL⁻¹ (Tabela 19). As maiores contaminações de cafeína foram encontradas nos pesque-pague A (3,899 ng mL⁻¹) e D (1,084 ng mL⁻¹) (Tabela 19).

Tabela 19. Valores totais de cafeína (ng mL⁻¹) encontrados nas águas de afluente e tanque de peixes dos cinco pesque-pague avaliados.

Períodos de Amostragens	Pesque-Pague	AA	AT	Total
Primavera	A	0,104	0,394	0,498
	B	0,147	0,000	0,147
	C	0,184	0,120	0,304
	D	0,470	0,000	0,470
	E	0,000	0,000	0,000
Verão	A	0,933	0,480	1,413
	B	0,000	0,215	0,215
	C	0,000	0,000	0,000
	D	0,078	0,158	0,236
	E	0,000	0,000	0,000
Outono	A	0,463	0,168	0,631
	B	0,000	0,000	0,000
	C	0,000	0,127	0,127
	D	0,179	0,104	0,283
	E	0,000	0,000	0,000
Inverno	A	0,584	0,774	1,358
	B	0,000	0,000	0,000
	C	0,000	0,000	0,000
	D	0,094	0,000	0,094
	E	0,066	0,000	0,066
Total		3,301	2,539	

No período de estiagem, as águas do afluente e do tanque de peixes dos pesque-pague apresentaram as maiores concentrações de cafeína, que corresponde à contaminação total de $2,936 \text{ ng mL}^{-1}$. A maior concentração nesse período se deve ao reduzido efeito de diluição causado pelo volume de água na bacia de drenagem, considerando que a quantidade de esgoto que chega ao rio é constante.

As características físicas e químicas da cafeína, como alta solubilidade, baixo coeficiente de partição octanol-água e volatilidade insignificante, confere a esse composto um perfil de bom e estável marcador relacionado à atividade humana (Ferreira e Arouca, 2005).

Estudo realizado por Gonçalves (2008) corrobora com os resultados da presente pesquisa. O autor detectou um aumento de duas vezes nas concentrações de cafeína, em pontos próximos a área urbana do rio Paquequer, durante a estação seca. De acordo com Canela et al. (2014), as principais fontes de contaminação de cafeína em águas superficiais são os efluentes de estações de tratamento de esgoto lançados nesses corpos d'água.

Essas informações podem explicar a ocorrência das maiores concentrações de cafeína nas águas do pesque-pague A, que se localiza logo abaixo da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da cidade de Jaboticabal. A ETE de Jaboticabal lança os seus efluentes no córrego que margeia o pesqueiro (Figura 18). A ETE se localiza na cota 545, acima do pesque-pague A, que se encontra localizado na cota 525 (Figura 18).

Diferente do pesque-pague A, no pesque-pague D não há Estação de Tratamento de Esgoto que lance efluente diretamente no Córrego do Coco, que margeia o pesqueiro D. No entanto, os efluentes das Estações de Tratamento de Esgoto das cidades de Santa Ernestina e Taquaritinga são lançados no Córrego Ribeirão dos Porcos (CETESB, 2015), cujas nascentes se localizam próxima à nascente que abastece o pesque-pague D. Esta proximidade indica que ambos são abastecidos pelo mesmo lençol freático.

Em decorrência dos lançamentos dos efluentes da ETE no Córrego Ribeirão dos Porcos, o lençol freático que abastece o pesque-pague D provavelmente está contaminado com cafeína, entre outros poluentes. Essa contaminação reflete

diretamente nos níveis encontrados de cafeína nas águas de afluente e de tanque de peixes do pesque-pague D.

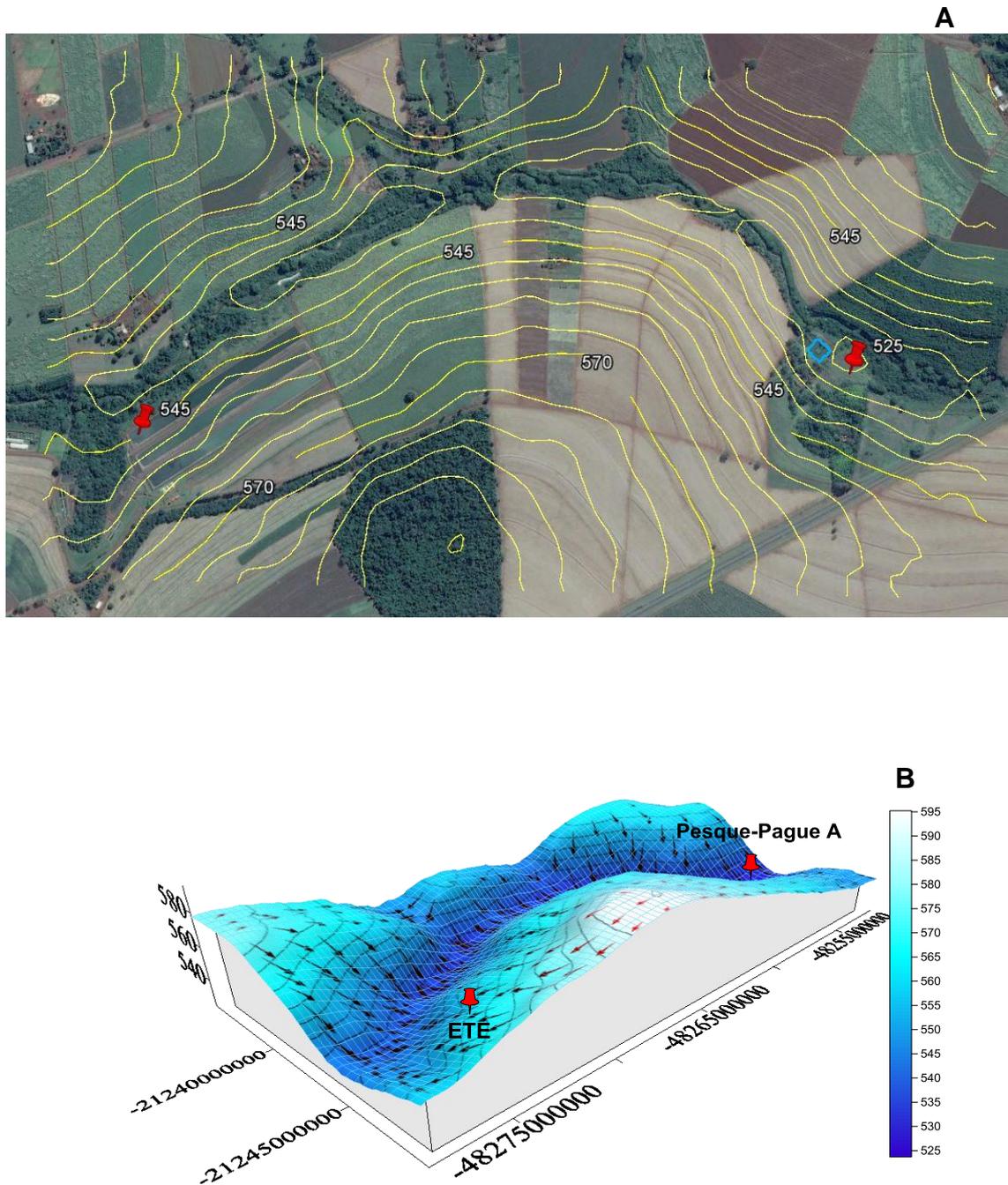


Figura 18. Imagem representativa da altimetria do terreno (A) e modelo digital de elevação (MDE) (B) entre a Estação Tratamento de Esgoto, na cota 545 e o pesque-pague A, na cota 525, às margens do Córrego Jaboticabal, SP.

Sodré et al. (2007), avaliaram a relação dos efluentes de estações de tratamento de esgoto como a principal fonte de contaminação da rede hidrográfica com a cafeína. Os autores detectaram maiores concentrações de cafeína nas águas do Ribeirão Anhumas, que recebe efluentes provenientes da região mais densamente urbanizada da bacia do rio Atibaia.

Nas águas da bacia hidrográfica de Leopoldina e marítima da Baía de Guanabara, Ferreira e Arouca (2005) constataram diferenças significativas nas concentrações de cafeína entre as áreas não afetadas por aportes de nutrientes ou de esgoto (0,134 a 0,147 ng mL⁻¹) e as áreas cronicamente influenciadas por descarga de esgoto e eutrofização (160,0 a 357,0 ng mL⁻¹).

Montagner e Jardim (2011) detectaram a cafeína na concentração de 127,0 ng mL⁻¹ em águas superficiais da bacia do rio Atibaia, principal manancial de abastecimento público da cidade de Campinas, SP.

Níveis significativos de cafeína também foram encontrados em outros corpos hídricos brasileiros, como nas águas do rio Iguaçu, região de Curitiba, PR, nas concentrações entre 1,7 – 123,4 ng mL⁻¹ e nos rios Piraí (0,011 – 0,213 ng mL⁻¹) e Jundiaí (0,993 – 19,329 ng mL⁻¹) no Estado de São Paulo (Froehner et al., 2011; Souza et al., 2014).

A contaminação das águas com a cafeína é um problema ambiental qualitativo e não quantitativo, pois devido ao seu alto grau de biodegradabilidade, a presença em pequenas quantidades em efluentes não coloca em risco a saúde humana e animal. No entanto, a presença da cafeína nas águas indica a existência de outros contaminantes de origem similar, que, consumidos ao longo do tempo, podem causar efeitos crônicos à saúde humana e animal (Jardim e Canela, 2012; Martini et al., 2015).

5.6. Toxicidade aguda das águas dos pesque-pague para organismos aquáticos

5.6.1. *Daphnia magna*

5.6.1.1. Ensaio de sensibilidade com a substância de referência NaCl

O valor de CE_{50-48h} calculado com os dados dos ensaios de sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) com a *D. magna* foi de $4,69 \text{ g L}^{-1}$, com limite inferior de $3,75 \text{ g L}^{-1}$ e limite superior de $5,62 \text{ g L}^{-1}$. Esse valor está entre os limites superior e inferior calculados na carta-controlé da cultura mantida no laboratório (Figura 19). Portanto, os organismos-teste estavam em condições normais de sanidade e sensibilidade e aptos para serem utilizados nos ensaios.

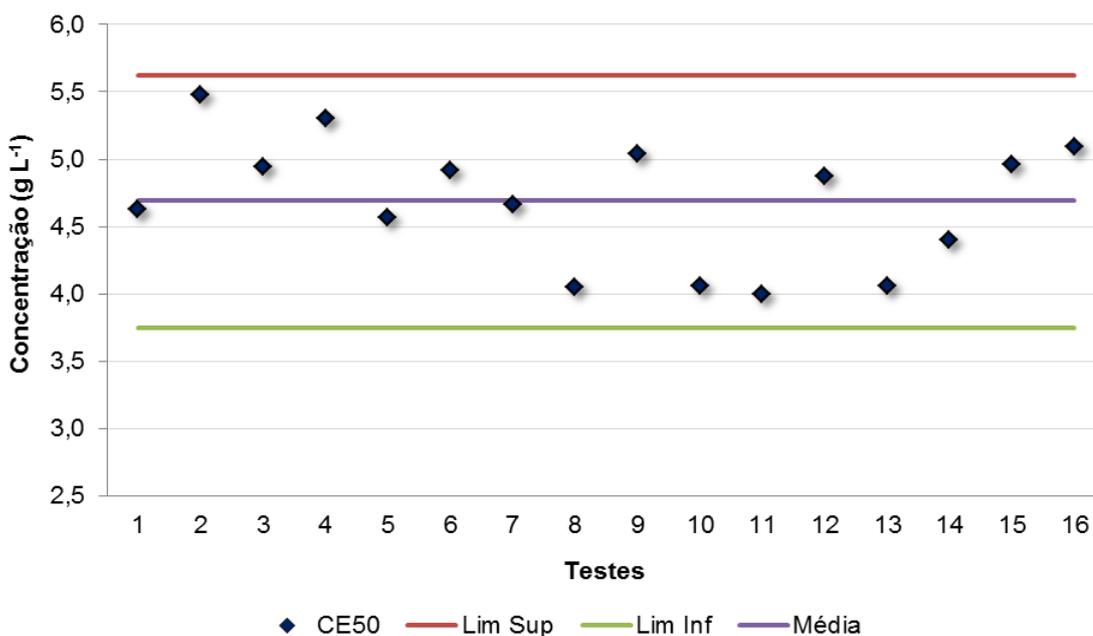


Figura 19. Carta controle do organismo *D. magna* para a substância de referência NaCl. Médias da CE_{50-48h} e limites superior e inferior.

5.6.1.2. Ensaios ecotoxicológicos com as águas dos pesque-pague

Pelos resultados dos ensaios definitivos, as águas de afluente e de tanque de peixes dos cinco pesque-pague durante o período de amostragem apresentaram baixa toxicidade para *D. magna*. Os organismos não sofreram imobilidade/mortalidade em nenhuma das amostras avaliadas.

Pelos valores das CE_{50-48h} calculados em outros estudos com os herbicidas detectados nas amostras de água dos pesque-pague (Tabela 20), se observam a baixa toxicidade para a *D. magna*. Por esses valores, os herbicidas se classificam

nas classes de toxicidade aguda propostas por Zucker (1985) como ligeiramente tóxicos a praticamente não tóxicos.

As concentrações dos herbicidas tebutiuron, metolacoloro, hexazinona, ametrina, atrazina e clomazone detectados nas águas dos pesque-pague foram inferiores aos valores de CE_{50-48h} calculados nos estudos listados na Tabela 20. As concentrações dos herbicidas nas águas dos pesque-pague inferiores aos valores de CE_{50-48h} , explicam a baixa toxicidade dessas águas para a *D. magna*.

Tabela 20. Valores de CE_{50-48h} ($mg L^{-1}$) para os herbicidas tebutiuron, hexazinona, metolacoloro, atrazina, ametrina e clomazone para cladóceros e suas classificações toxicológicas de acordo com Zucker (1985).

Herbicida	Organismo	CE_{50-48h} ($mg L^{-1}$)	Classificação Zucker (1985)	Referência
Hexazinona	<i>C. dubia</i>	105,5	Praticamente não tóxico	Silva et al. (2013a)
	<i>D. magna</i>	151,6	Praticamente não tóxico	Montague, 2000
Tebutiuron	<i>D. magna</i>	259,6	Praticamente não tóxico	Presente estudo
Atrazina	<i>D. magna</i>	50,4	Ligeiramente tóxico	Moreira et al. (2014)
	<i>Daphnia carinata</i>	60,6	Ligeiramente tóxico	Hongzhi et al. (2012)
Ametrina	<i>D. magna</i>	28,0 - 45,2	Ligeiramente tóxico	Rebelo e Caldas, 2014
Metolacoloro	<i>D. magna</i>	23,5	Ligeiramente tóxico	UH, 2016
Clomazone	<i>D. magna</i>	12,7	Ligeiramente tóxico	UH, 2016
	<i>D. magna</i>	14,3	Ligeiramente tóxico	Nakagome, et al. (2006)

Henrique e Brentano (2010) encontraram resultados similares em amostras de águas de diferentes pontos do rio Papaquara, localizado na bacia hidrográfica do Rio Ratoles. Esse rio é um dos principais da Ilha de Santa Catarina e passa por áreas de grande ocupação urbana. Nesse estudo, todas as amostras de água foram classificadas como pouco tóxicas para *D. magna*.

De forma similar aos herbicidas, a cafeína detectada nas amostras de água dos pesque-pague também apresentou baixa toxicidade ao organismo *D. magna*. A CE_{50-48h} média calculada nesse estudo para essa espécie foi de $229,7 mg L^{-1}$. Com esse valor, a cafeína se classifica como praticamente não tóxica, pelas classes propostas por Zucker (1985). Da mesma forma que os herbicidas, o valor de CE_{50-48h} da cafeína para *D. magna* é superior aos valores detectados nas amostras de água ($0,066 - 2,083 ng mL^{-1}$) e explica a baixa toxicidade das amostras das águas dos pesque-pague.

5.6.2. *Lemna minor*

5.6.2.1. Ensaios de sensibilidade com a substância de referência NaCl

Os ensaios de sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) para o organismo-teste *L. minor* confirmaram a sanidade e a sensibilidade da macrófita aquática cultivada no laboratório. O valor de CI_{50-7d} está dentro dos limites de aceitabilidade da carta controle do laboratório (Figura 20). O valor de CI_{50-7d} para NaCl foi de $4,16 \text{ g L}^{-1}$, com limite inferior de $3,01 \text{ g L}^{-1}$ e limite superior de $5,31 \text{ g L}^{-1}$.

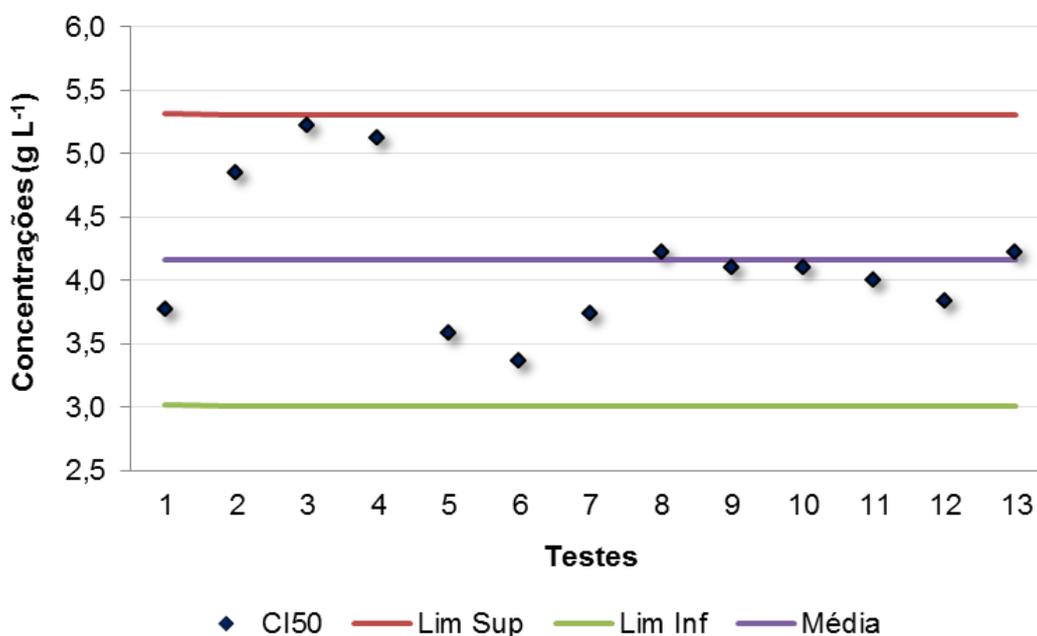


Figura 20. Carta controle do organismo *L. minor* para a substância de referência NaCl. Médias da CI_{50-7d} e limites superior e inferior.

5.6.2.2. Ensaios ecotoxicológicos com as águas dos pesque-pague

O crescimento do organismo *L. minor* foi significativamente reduzido quando exposto por sete dias nas águas de afluente e de tanque dos cinco pesque-pague (Figura 21).

Nos resultados contidos na Figura 21 se observam as porcentagens de inibição de crescimento das frondes ao final dos testes com as concentrações

crescentes das águas dos cinco pesque-pague nos períodos de coleta (estiagem e chuva) e nos dois pontos de amostragem (água de afluyente e de tanque).

Na Figura 21 se observa um aumento significativo ($p < 0,01$) na taxa de inibição de crescimento das frondes da macrófita aquática com o aumento das concentrações das águas coletadas no meio de cultivo da *L. minor*.

Nas Tabelas 14 e 19 verificam-se os valores totais (ng mL^{-1}) dos herbicidas e cafeína, respectivamente, detectados nas águas de afluyente e de tanque de peixes dos pesque-pague para cada período de amostragem.

A inibição de crescimento das frondes de *L. minor*, observado durante os ensaios de toxicidade pode não estar relacionada com as concentrações dos herbicidas e cafeína nas águas ensaiadas (Tabelas 14 e 19). Essa explicação pode ser corroborada pelos valores de CI_{50-7d} , encontrados em outros estudos, para os contaminantes detectados nas amostras de água dos pesque-pague.

Apesar de a macrófita aquática pertencer ao nível trófico alvo para a ação dos herbicidas, as CI_{50-7d} calculadas para os agrotóxicos detectados nas águas dos pesque-pague (Tabela 21) são relativamente maiores que as concentrações determinadas nas amostras de águas nesse estudo.

De forma similar aos herbicidas, a CI_{50-7d} calculada de cafeína nesse estudo para *L. minor* foi de $212,8 \text{ mg L}^{-1}$, portanto superior aos valores detectados nas amostras de água ($0,066 - 2,083 \text{ ng mL}^{-1}$). A CI_{50-7d} calculada classifica a cafeína como praticamente não tóxica, de acordo com as classes de Zucker (1985).

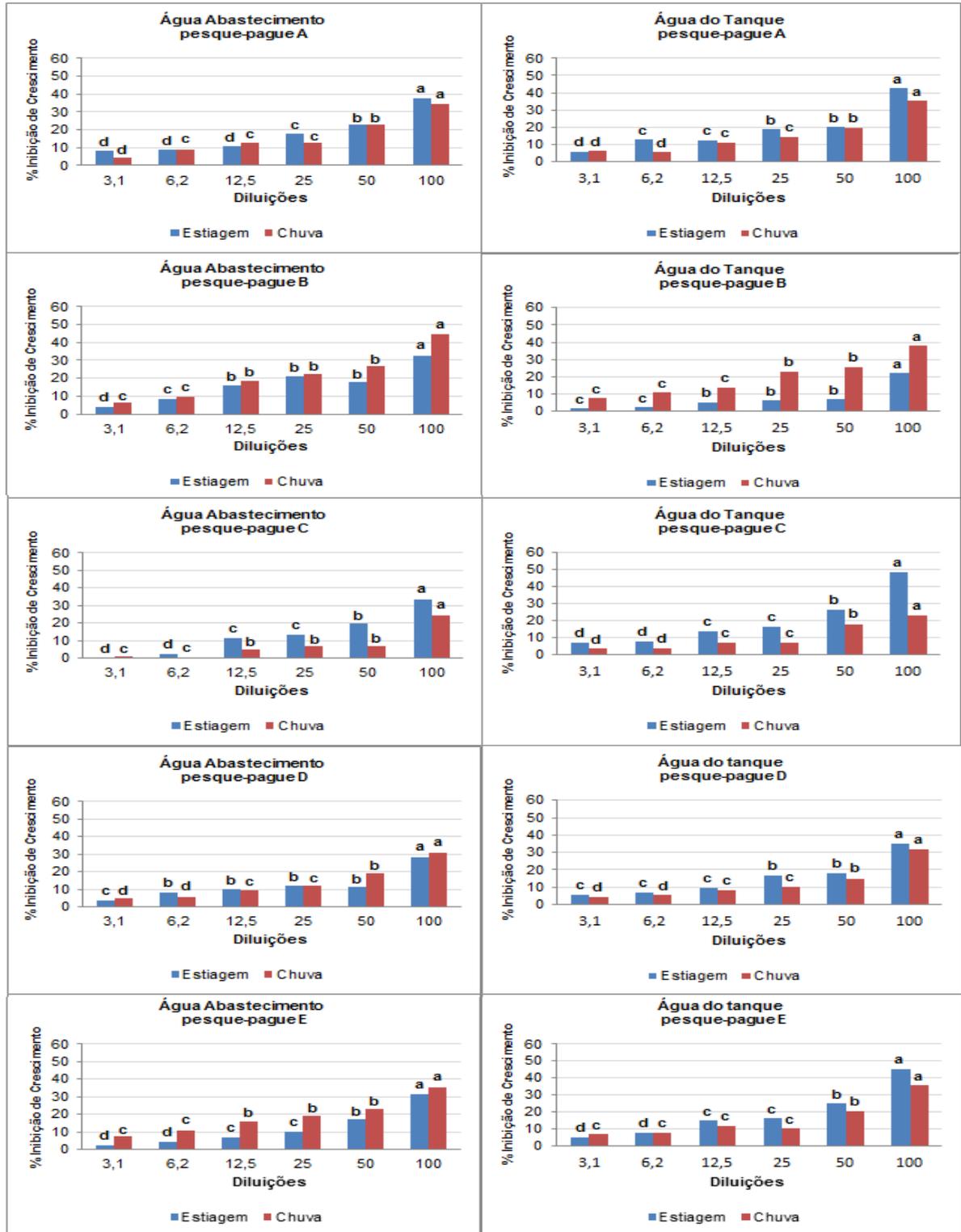


Figura 21. Porcentagem de inibição de crescimento de *L. minor* no sétimo dia de exposição a concentrações crescentes de água de afluente (A) e de tanque (B) dos pesque-pague. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 21. Valores de CI_{50-7d} para os herbicidas tebutiuron, hexazinona, metolacloro, atrazina, ametrina e clomazone para macrófitas aquáticas e suas classificações toxicológicas de acordo com Zucker (1985).

Herbicida	Organismo	CI_{50-7d} ($mg L^{-1}$)	Classificação Zucker (1985)	Referência
Hexazinona	<i>L. minor</i>	>0,072	Extremamente tóxico	UH, 2016.
Tebutiuron	<i>L. minor</i>	0,072	Extremamente tóxico	Presente estudo
Atrazina	<i>Lemna gibba</i>	0,019	Extremamente tóxico	UH, 2016
Ametrina	<i>Lemna perpusilla</i>	0,010	Extremamente tóxico	UH, 2016
Metolacloro	<i>L. gibba</i>	0,043	Extremamente tóxico	UH, 2016
Clomazone	<i>L. gibba</i>	34,0	Ligeiramente tóxico	UH, 2016
	<i>A. Caroliniana</i>	129,6	Praticamente não tóxico	Silva et al., 2012a

Nos ensaios de toxicidade com as águas de afluentes e de tanque de peixes com *L. minor*, se observa que nos recipientes controles, com apenas o meio de cultivo, a condutividade elétrica variou entre 1031,0 e 1243,1 $\mu S cm^{-1}$. Por outro lado, nos recipientes contendo apenas as águas coletadas (100% afluentes e água do tanque), a condutividade elétrica variou entre 166,5 e 36,1 $\mu S cm^{-1}$ (Figura 22).

De acordo com Bini et al. (1999) existe uma correlação positiva entre concentrações de nutrientes nas águas e a condutividade elétrica. Dessa forma, há uma relação direta entre os teores de sais dissolvidos (ânions e cátions) e a condutividade elétrica da água.

Na Tabela 22, se observam correlações negativas entre a porcentagem de inibição do crescimento das frondes de *L. minor* e a condutividade elétrica da água, o que corrobora os resultados contidos nas Figuras 21 e 22. A correlação negativa significativa, proporcionalidade inversa entre as variáveis, se classifica como muito forte a forte, de acordo com as classes de valores de correlação de Pearson citadas por Hinkle, et al. 2003.

De acordo com a Tabela 23, se constata que a falta dos sais dissolvidos (nutrientes) nas águas dos pesque-pague, muito inferiores às do meio de cultivo, é o fator determinante da inibição de crescimento das frondes de *L. minor*.

Estudos realizados por Bini et al. (1999) e Pezzato (2007) corroboraram os resultados da presente pesquisa. Bini et al. (1999) verificaram uma associação positiva entre a distribuição geográfica da população de macrófita *Eichhornia crassipes*, ao longo da costa oriental do reservatório de Itaipu, com as altas

concentrações de nutrientes (fósforo total e nitrogênio total) e altos valores de condutividade elétrica.

Pezzato (2007) observou a influência positiva de variáveis físicas e químicas da água, como baixa transparência, altos valores de temperatura, condutividade elétrica e concentrações de nutrientes, nas taxas fotossintéticas da macrófita aquática *Cabomba furcata*.

Tabela 22. Coeficientes de correlação entre as variáveis % de inibição de crescimento de *L. minor* e condutividade elétrica no sétimo dia de experimentação com os efluentes coletados entre o período de Junho/2014 a Maio/2015 nos cinco pesque-pague.

Pesque- Pague	Estiagem		Chuva	
	AA	AT	AA	AT
A	-0,96**	-0,94**	-0,94**	-0,96**
B	-0,86*	-0,97**	-0,93**	-0,92**
C	-0,95**	-0,98**	-0,97**	-0,95**
D	-0,92**	-0,96**	-0,96**	-0,98**
E	-0,99**	-0,98**	-0,90**	-0,97**

Teste de coeficiente de correlação de Pearson (r); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$).

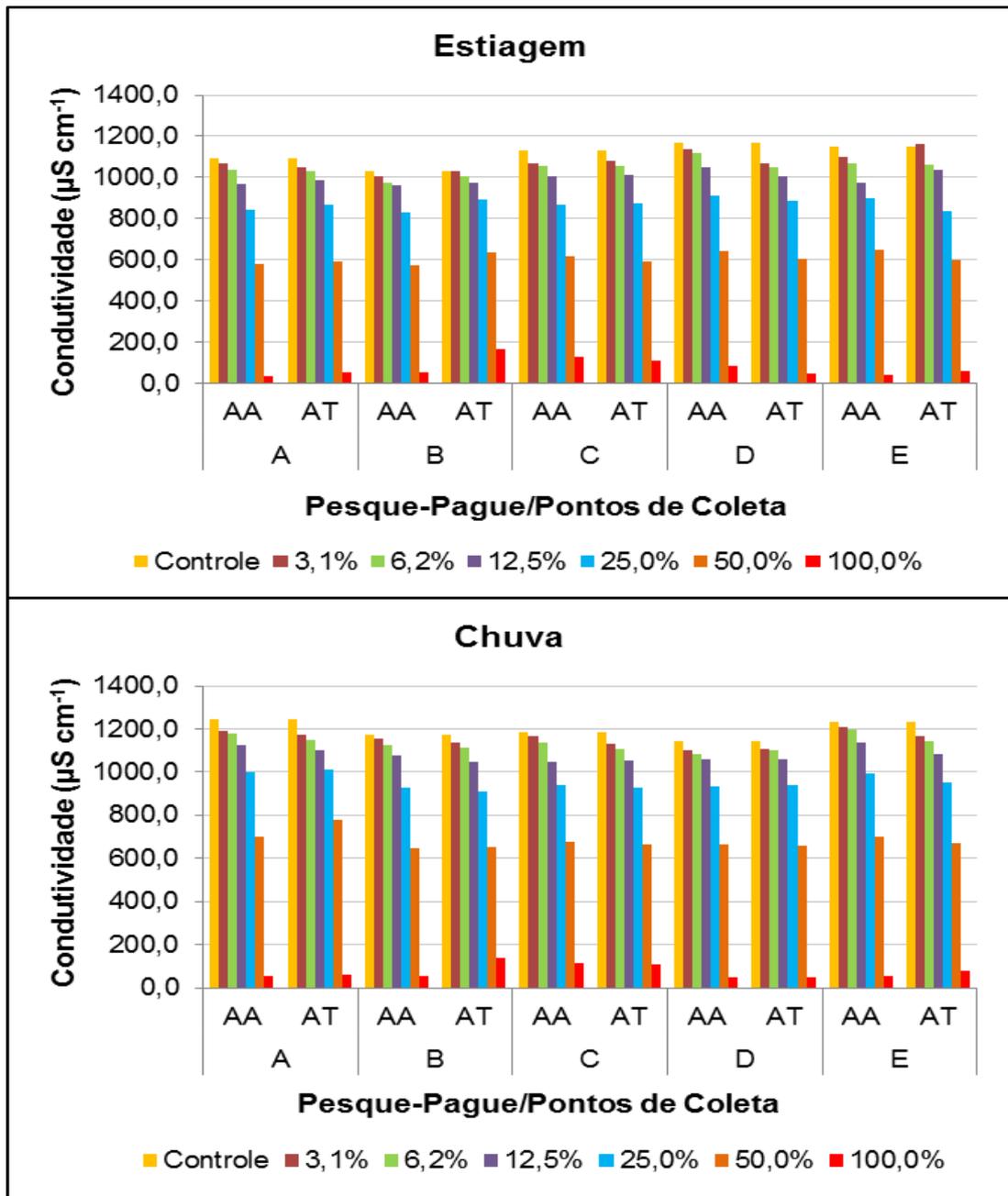


Figura 22. Valores de condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$), para o sétimo dia do teste de toxicidade aguda com *L. minor*, das águas de afluente (AA) e de tanque (AT) coletadas entre o período de Junho/2014 a Maio/2015 nos cinco pesque-pague avaliados.

Tabela 23. Valores totais ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de cátions e ânions nas águas de afluente e de tanque de peixes dos cinco pesque-pague e na solução de meio de cultivo do organismo *L. minor*.

	A		B		C		D		E		Total		Meio de Cultivo
	AA	AT	AA	AT									
Ca	51,35	80,85	49,25	80,80	74,25	52,95	68,65	48,10	46,50	45,15	290,00	307,85	54.250,00
Cu	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,91
Fe	0,00	0,03	0,01	0,07	0,00	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,34	100,00
K	5,75	9,20	11,05	17,30	19,45	19,95	11,55	9,90	14,80	15,15	62,60	71,50	78.127,90
Mg	4,40	6,50	4,85	9,70	15,40	8,60	8,55	4,55	4,40	4,90	37,60	34,25	24.264,50
Mn	0,03	0,03	0,00	0,05	0,15	0,04	0,26	0,02	0,00	0,02	0,44	0,15	505,34
Na	15,88	23,61	17,80	5,07	25,49	10,70	16,26	19,69	16,45	23,44	91,88	82,51	17,09
Zn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	50,04
Cl ⁻	8,64	13,85	11,82	29,62	32,90	37,91	17,21	14,16	12,62	19,56	83,19	115,10	842,77
NO ₃ ⁻	0,18	0,00	2,68	5,67	0,24	0,00	4,59	1,18	7,30	0,10	15,00	6,94	146.036,70
SO ₄ ²⁻	1,34	1,28	0,39	2,32	6,63	10,62	0,78	1,09	0,83	1,48	9,97	16,80	96.027,76
PO ₄ ³⁻	0,16	0,58	0,13	0,72	0,22	0,64	0,17	0,11	0,12	0,15	0,80	2,20	94.928,10

O pH é outra variável da água muito importante para o crescimento das macrófitas aquáticas. No presente estudo foi constatado que o pH da água se correlaciona positivamente com a inibição de crescimento das frondes de *L. minor* após sete dias de exposição (Tabela 24). Os valores de pH durante todos os ensaios ecotoxicológicos com as águas de afluente e de tanque, coletadas dos pesque-pague, variaram entre 6,6 e 8,8 (Figura 23).

Os valores de pH determinados nas soluções testes dos ensaios provavelmente reduziram a disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento das macrófitas. Isto porque, a importância dessa variável está em manter em solução todos os elementos disponíveis às plantas (Braccini et al., 1999). Como os valores de pH estavam acima de 6,5 (Figura 23), nutrientes como sulfato, fosfato, ferro e manganês precipitaram e se tornaram indisponível à planta (Braccini et al., 1999).

Outra influencia do pH no crescimento de *L. minor* foi por meio da maior disponibilidade de HCO₃⁻, que provocou a redução na taxa fotossintética das macrófitas aquáticas (Pierini e Thomaz, 2004; Biudes e Camargo, 2008).

De acordo com os resultados apresentados, constata-se que a inibição de crescimento das frondes da macrófita aquática *L. minor* deve-se às baixas concentrações dos nutrientes nas águas dos pesque-pague, em relação às do

meio de cultivo, e não as concentrações reduzidas dos herbicidas e cafeína nas águas que ficaram expostas durante os períodos de exposição nos ensaios.

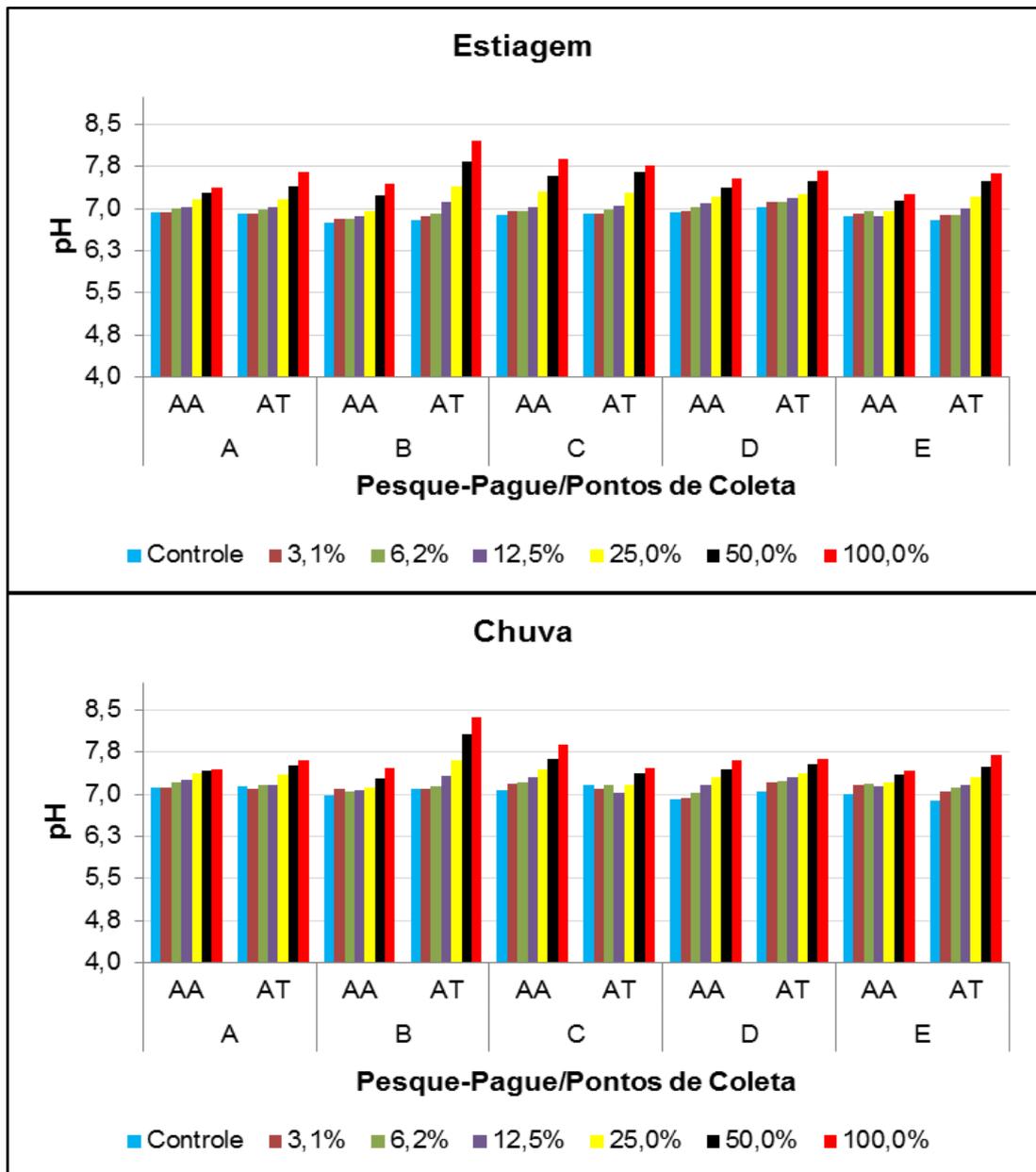


Figura 23. Valores de pH, para o sétimo dia do teste de toxicidade aguda com *L. minor*, das águas de afluente (AA) e de tanque (AT) coletadas entre o período de Junho/2014 a Maio/2015 nos cinco pesque-pague avaliados.

Tabela 24. Coeficientes de correlação entre as variáveis % de inibição de crescimento das frondes de *L. minor* e pH, para o sétimo dia de experimentação com os efluentes coletados entre o período de Junho/2014 a Maio/2015 nos cinco pesque-pague avaliados.

Pesque- Pague	Estiagem		Chuva	
	AA	AT	AA	AT
A	0,96**	0,94**	0,80*	0,84*
B	0,77*	0,85*	0,81*	0,91**
C	0,95**	0,94**	0,92**	0,93**
D	0,90**	0,95**	0,96**	0,91**
E	0,77*	0,81*	0,93**	0,96**

Teste de coeficiente de correlação de Pearson (r); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$); ns não significativo ($p > 0.05$).

5.7. Toxicidade aguda dos contaminantes prevalentes das amostras de água dos pesque-pague para os organismos aquáticos *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Oreochromis niloticus*

5.7.1. Ensaios de sensibilidade com a substância de referência KCl para *O. niloticus*

Os ensaios de sensibilidade dos organismos foram realizados para as três espécies em estudo de acordo com os respectivos procedimentos das normas utilizadas. A carta controle dos lotes dos peixes utilizados no laboratório pode ser observada na Figura 24.

O valor de CL_{50-48h} calculado dos ensaios de sensibilidade com cloreto de potássio (KCl) para *O. niloticus* foi de $1,12 \text{ g L}^{-1}$, com limite inferior de $0,95 \text{ g L}^{-1}$ e limite superior de $1,30 \text{ g L}^{-1}$. De maneira semelhante ao ocorrido para os testes de sensibilidade com *D. magna* (Figura 19) e *L. minor* (Figura 20), o valor do teste de sensibilidade para *O. niloticus* está entre os limites superior e inferior calculados na carta-controle da cultura mantida no laboratório (Figura 24). Portanto, os organismos-teste estavam em condições normais de sanidade e sensibilidade e aptos para serem utilizados nos ensaios.

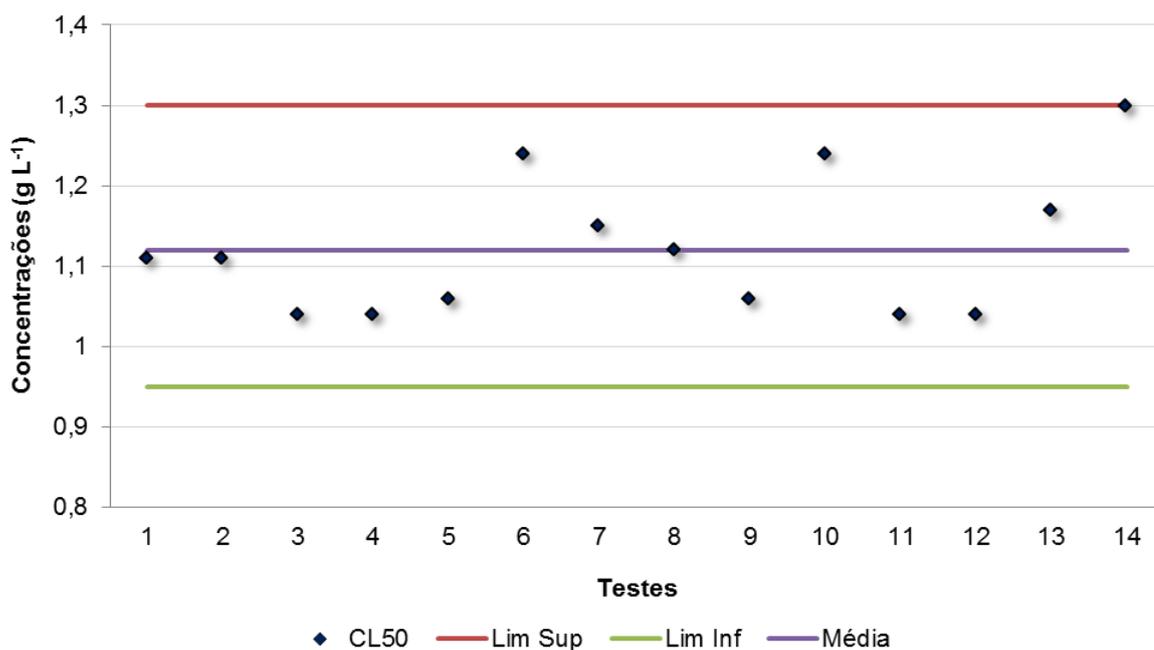


Figura 24. Carta controle do organismo *O. niloticus* para a substância de referência KCl. Médias da CL_{50-48h} e limites superior e inferior.

5.7.2. Toxicidade do tebutiuron e cafeína para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Oreochromis niloticus*.

Para o tebutiuron, a concentração efetiva mediana (CE_{50-48h}) estimada para a *D. magna* foi de 248,71 mg L⁻¹, com LI de 219,58 mg L⁻¹ e LS de 281,83 mg L⁻¹. Para a cafeína, a CE_{50-48h} estimada foi de 229,71 mg L⁻¹, com LI de 185,24 mg L⁻¹ e LS de 287,12 mg L⁻¹.

Com esses valores, para a *D. magna*, o tebutiuron e a cafeína são classificados na classe praticamente não tóxicos, de acordo com Zucker (1985), e na classe pouco tóxicos, no sistema de classificação do potencial de periculosidade ambiental proposto pelo IBAMA (2015).

Para *L. minor*, a concentração inibitória mediana (CI_{50-7d}) para o herbicida tebutiuron foi de 0,06 mg L⁻¹, com LI de 0,05 mg L⁻¹ e LS de 0,06 mg L⁻¹. Para a cafeína, a CI_{50-7d} foi de 212,78 mg L⁻¹, com LI de 197,95 mg L⁻¹ e LS de 228,74 mg L⁻¹.

Nesse caso, para a *L. minor*, o herbicida é classificado na classe extremamente tóxico (Zucker, 1985), e altamente tóxico (IBAMA, 2015). Por outro lado, a cafeína se classifica na classe praticamente não tóxica (Zucker, 1985), e pouca tóxica (IBAMA, 2015).

Nos resultados contidos na Figura 25, se observa que a formação de frondes de *L. minor* é inversa ao aumento da concentração de tebutiuron na solução-teste. A inibição de crescimento da macrófita aquática pelo tebutiuron é ocasionada pela ligação do herbicida ao sítio de ligação do transportador de elétrons Q_B , na proteína D1 do Fotossistema II. Essa ligação do herbicida causa o bloqueio do transporte de elétrons de Q_A para Q_B . Esse bloqueio causa a interrupção na fixação de CO_2 e nas produções de ATP e $NADPH_2$, que são essenciais ao crescimento da planta (Oliveira e Brighenti, 2011).

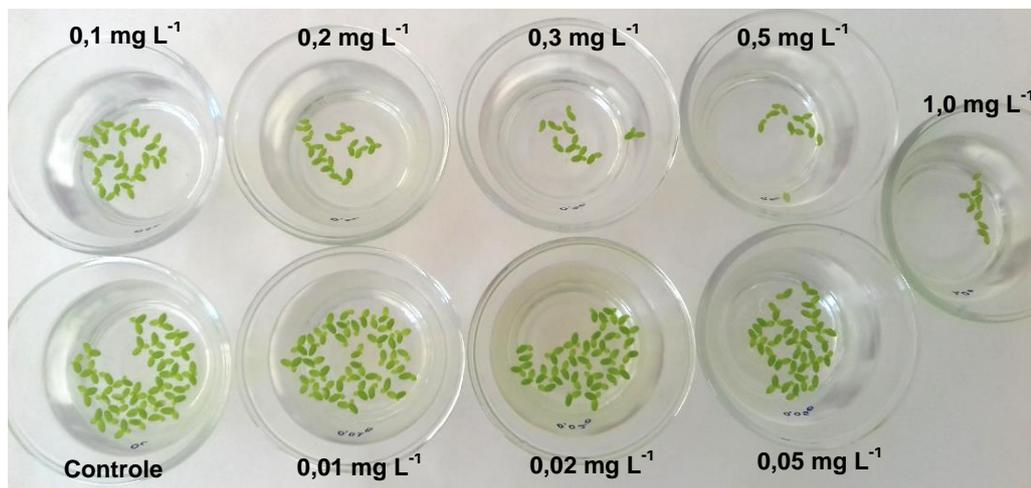


Figura 25. Diminuição do número de frondes de *L. minor* nos testes de toxicidade, após sete dias de exposição ao herbicida tebutiuron.

Para o herbicida tebutiuron, a concentração letal mediana calculada para *O. niloticus* foi de $22,67 \text{ mg L}^{-1}$, com LI de $21,42 \text{ mg L}^{-1}$ e LS de $24,01 \text{ mg L}^{-1}$. Com esses valores, o herbicida foi classificado como ligeiramente tóxico (Zucker, 1985) e medianamente tóxico (IBAMA, 2015).

Devido ao mecanismo de ação do herbicida ser específico para plantas, inibição da fotossíntese, não se espera alta toxicidade para peixes e para outros organismos de diferentes níveis tróficos de produtores (Stephenson e Solomon, 2007; Solomon et al., 2014).

Para a cafeína, a CL_{50-48h} calculada foi de $212,70 \text{ mg L}^{-1}$, com LI de $197,85 \text{ mg L}^{-1}$ e LS de $228,86 \text{ mg L}^{-1}$. Com esse valor, a cafeína se classifica como praticamente não tóxica (Zucker, 1985) e pouco tóxica (IBAMA, 2015).

Na Figura 26 se encontram as curvas de imobilidade/mortalidade para *D. magna*; na Figura 27, a % de inibição de crescimento da *L. minor*; e na Figura 28, a mortalidade de *O. niloticus* para o tebutiuron e a cafeína.

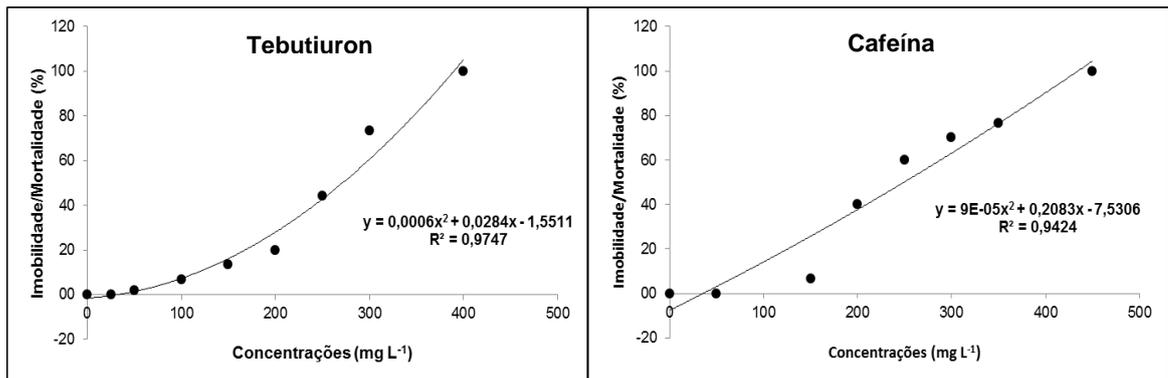


Figura 26. Porcentagem de imobilidade/mortalidade para *D. magna* em concentrações crescentes de tebutiuron e cafeína.

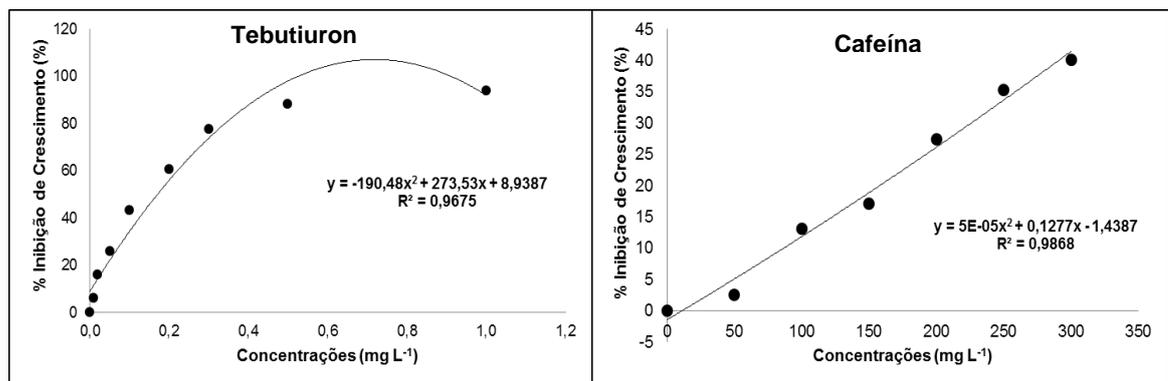


Figura 27. Porcentagem de inibição de crescimento para *L. minor* em concentrações crescentes de tebutiuron e cafeína.

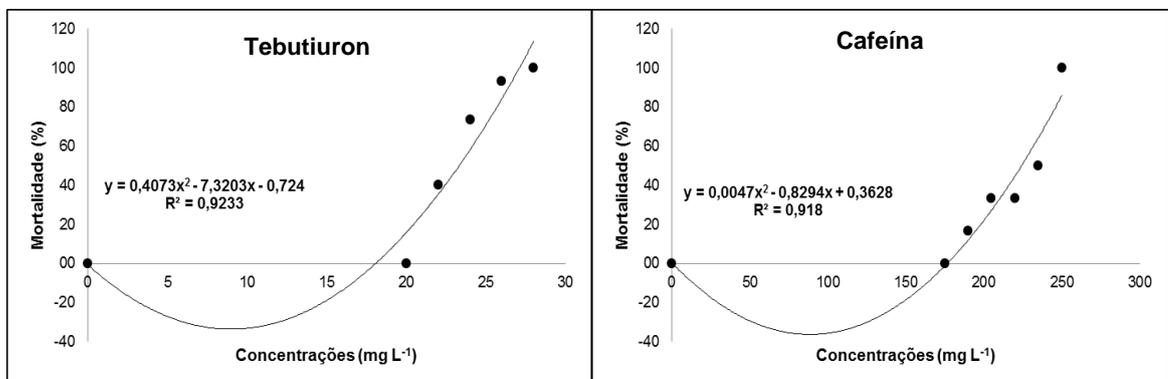


Figura 28. Porcentagem de mortalidade para *O. niloticus* em concentrações crescentes de tebutiuron e cafeína.

Estudos de toxicidade do herbicida tebutiuron em organismos aquáticos corroboram os resultados encontrados no presente estudo. Em estudos similares, foram calculados valores de CL_{50-96h} entre 87,0 a 144,0 $mg L^{-1}$ para *Oncorhynchus mykiss*; 87,0 a 112,0 $mg L^{-1}$ para *Lepomis macrochirus*; e maiores do que 160,0 $mg L^{-1}$ para *Pimephales promelas* e *Carassius auratus* (Exttoxnet, 2016; UH, 2016). Por esses valores, o tebutiuron se classifica como ligeiramente tóxico a praticamente não tóxico (Zucker, 2005) e medianamente tóxico a pouco tóxico (IBAMA, 2015).

Nos ensaios de toxicidade aguda do tebutiuron para *D. magna* se constatam a baixa toxicidade do herbicida para a espécie de microcrustáceo. Em estudos similares foi calculado o valor de CE_{50-48h} de 225,0 $mg L^{-1}$ (Exttoxnet, 2016; UH, 2016), que classifica o tebutiuron na classe de produto praticamente não tóxico (Zucker, 2005) e pouco tóxico (IBAMA, 2015). Para a macrófita aquática *L. gibba* valores maiores que 0,135 $mg L^{-1}$ mostram a alta toxicidade deste produto ao organismo, mesmo em baixas concentrações (UH, 2016).

Para a cafeína, resultados semelhantes ao presente estudo, mostram a baixa toxicidade deste produto aos organismos aquáticos. Chen et al. (2008) e Yeh et al. (2012) observaram que concentrações superiores a 300,0 $mg L^{-1}$ provoca a morte de embriões de *D. rerio*. Porém, quando expostos a concentrações de 150,0 $mg L^{-1}$, os autores não observaram mortalidade dos organismos, no entanto, puderam constatar efeitos no desenvolvimento e diminuição da capacidade de locomoção.

Pelos resultados de ensaios ecotoxicológicos se comprovam que a cafeína apresenta baixos riscos para os organismos marinhos e de água doce, pois as concentrações capazes de provocar efeitos na sobrevivência, crescimento e reprodução são muito mais elevadas que as determinadas em amostras de águas no ambiente (Capolupo et al., 2016).

Em estudos com a cafeína foram calculados os valores de CL_{50-48h} de 100,0 $mg L^{-1}$ para *Pimephales promelas* (Moore et al., 2008), de CE_{50-48h} de 60,0 $mg L^{-1}$ e de CE_{50-96h} de 151,0 $mg L^{-1}$ para *Cerodaphnia dubia* (Russom et al., 1997).

5.7.3. Risco ambiental do herbicida tebutiuron para os organismos *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Oreochromis niloticus*

O tebutiuron se classifica na classe baixo risco de intoxicação ambiental para *D. magna* e *O. niloticus* (Goktepe et al., 2004), independente da dose (diluição da CAE) e da profundidade, pois todos os valores de QR são inferiores a 0,05 (Tabelas 25, 26 e 27). Como as concentrações de tebutiuron encontradas nas águas dos pesque-pague são inferiores aos valores das concentrações de toxicidade aguda, o tebutiuron oferece baixo riscos de intoxicação ambiental para os organismos aquáticos *D. magna* e *O. niloticus*.

Por outro lado, para a macrófita aquática *L. minor*, o tebutiuron se classifica na classe extremamente tóxico (Zucker, 2005) e altamente tóxico (IBAMA, 2015). Devido à toxicidade, o tebutiuron se classifica na classe alto a médio risco de intoxicação ambiental para a *L. minor* e baixo risco de intoxicação ambiental nos cenários com as diluições 3,12% e 1,56% na profundidade de 2,0 m, e no de 6,25%, 3,12% e 1,56% na profundidade de 3,0 m.

De acordo com Pinheiro et al. (2012), existe uma relação inversa entre a profundidade de um corpo d'água e a quantidade de macrófitas aquáticas presente no ambiente. Diante desta informação, em adição à *L. minor* ser uma espécie flutuante, pode-se esperar que a quantidade da macrófita aquática seja mais elevada na profundidade de 0,3 m; cenário em que o herbicida se classifica como de alto a médio risco de intoxicação ambiental para essa espécie.

Um dos efeitos da rápida diminuição da biomassa de macrófitas no sistema aquático pode ser a privação de oxigênio a peixes e a outros organismos, além de mudanças no habitat, que ficará com falta de alimentos e abrigos (Stephenson e Solomon, 2007; Solomon et al., 2014).

Tabela 25. Valores de Quociente de Risco (QR) e suas respectivas classificações de risco do herbicida tebutiuron para os organismos *D. magna*, *L. minor* e *O. niloticus* na profundidade de 0,30 m.

Diluições da CAE	Espécies		
	<i>D. Magna</i>	<i>L. minor</i>	<i>O. niloticus</i>
100% (0,40 mg L ⁻¹)	0,0016 Baixo Risco	6,67 Alto Risco	0,0176 Baixo Risco
50% (0,20 mg L ⁻¹)	0,0008 Baixo Risco	3,33 Alto Risco	0,0088 Baixo Risco
25% (0,10 mg L ⁻¹)	0,0004 Baixo Risco	1,67 Alto Risco	0,0044 Baixo Risco
12,5% (0,05 mg L ⁻¹)	0,0002 Baixo Risco	0,83 Alto Risco	0,0022 Baixo Risco
6,25% (0,025 mg L ⁻¹)	0,0001 Baixo Risco	0,42 Médio Risco	0,0011 Baixo Risco
3,12% (0,012 mg L ⁻¹)	0,00005 Baixo Risco	0,21 Médio Risco	0,0005 Baixo Risco
1,56% (0,006 mg L ⁻¹)	0,00003 Baixo Risco	0,10 Médio Risco	0,0003 Baixo Risco

Tabela 26. Valores de Quociente de Risco (QR) e suas respectivas classificações de risco do herbicida tebutiuron para os organismos *D. magna*, *L. minor* e *O. niloticus* na profundidade de 2,0 m.

Diluições da CAE	Espécies		
	<i>D. Magna</i>	<i>L. minor</i>	<i>O. niloticus</i>
100% (0,06 mg L ⁻¹)	0,0002 Baixo Risco	1,00 Alto Risco	0,0026 Baixo Risco
50% (0,03 mg L ⁻¹)	0,0001 Baixo Risco	0,50 Médio Risco	0,0013 Baixo Risco
25% (0,015 mg L ⁻¹)	0,00006 Baixo Risco	0,25 Médio Risco	0,0006 Baixo Risco
12,5% (0,0075 mg L ⁻¹)	0,00003 Baixo Risco	0,12 Médio Risco	0,0003 Baixo Risco
6,25% (0,0037 mg L ⁻¹)	0,00002 Baixo Risco	0,06 Médio Risco	0,0002 Baixo Risco
3,12% (0,0019 mg L ⁻¹)	0,00001 Baixo Risco	0,03 Baixo Risco	0,00008 Baixo Risco
1,56% (0,0009 mg L ⁻¹)	0,000004 Baixo Risco	0,01 Baixo Risco	0,00004 Baixo Risco

Tabela 27. Valores de Quociente de Risco (QR) e suas respectivas classificações de risco do herbicida tebutiuron para os organismos *D. magna*, *L. minor* e *O. niloticus* na profundidade de 3,0 m.

Diluições da CAE	Espécies		
	<i>D. Magna</i>	<i>L. minor</i>	<i>O. niloticus</i>
100% (0,04 mg L ⁻¹)	0,0002 Baixo Risco	0,67 Alto Risco	0,0018 Baixo Risco
50% (0,02 mg L ⁻¹)	0,0001 Baixo Risco	0,33 Médio Risco	0,0009 Baixo Risco
25% (0,01 mg L ⁻¹)	0,00004 Baixo Risco	0,17 Médio Risco	0,0004 Baixo Risco
12,5% (0,005 mg L ⁻¹)	0,00002 Baixo Risco	0,08 Médio Risco	0,0002 Baixo Risco
6,25% (0,0025 mg L ⁻¹)	0,00001 Baixo Risco	0,04 Baixo Risco	0,0001 Baixo Risco
3,12% (0,0012 mg L ⁻¹)	0,00001 Baixo Risco	0,02 Baixo Risco	0,00006 Baixo Risco
1,56% (0,0006 mg L ⁻¹)	0,000003 Baixo Risco	0,01 Baixo Risco	0,00003 Baixo Risco

As classificações do herbicida tebutiuron pela toxicidade e pelos riscos de intoxicação ambiental para *L. minor* podem se constituir em alerta quanto à possibilidade de comprometimento da saúde ambiental de microbacias hidrográficas ocupadas pela cultura de cana-de-açúcar.

5.8. Considerações gerais sobre o uso e os efeitos dos agrotóxicos

Os agrotóxicos são constituídos por uma grande variedade de substâncias químicas que atuam sobre processos vitais (Peres et al., 2003). A elevada utilização dos agrotóxicos tem ocasionado incalculáveis prejuízos à saúde humana, animal e ambiental (Brito et al., 2009).

Dentre os casos de impactos negativos dos agrotóxicos a organismos não alvos, os seres humanos são muito afetados, pois se expõem aos agrotóxicos por meio da ingestão de água e alimentos contaminados. A exposição humana aos agrotóxicos também ocorre vias dérmicas e inalatórias nas aplicações domésticas ou pulverizações em culturas ou ambientes públicos (Nunes e Tajara, 1998; Ribas e Matsumura, 2009).

Em estudo realizado no município de Lucas do Rio Verde, MT, foram detectadas a presença de resíduos do herbicida glifosato, de inseticidas piretróides e de alguns compostos organoclorados no sangue e na urina de moradores da zona urbana e rural (Moreira et al., 2010).

A presença de resíduos de agrotóxicos de diferentes classes químicas também já foi constatada em leite materno de mães residentes de diferentes regiões do Brasil (Matuo et al., 1992; Mesquita, 2001; Krauss et al., 2004; Caleffi, 2005; Palma, 2011).

Diversos estudos têm relatado as associações positivas entre a exposição humana a agrotóxicos e problemas de saúde, tais como o aumento na incidência de câncer em próstata, pulmão, colorretal, pâncreas, ovários, testículos, pele (melanoma), sangue (leucemia), sistema linfático (linfoma não Hodgkin), mama, entre outros (Burns, 2005; Devillers et al., 2011; Alavanja e Bonner, 2012; Alavanja et al., 2013).

Outros problemas de saúde que também podem ocorrer devido à exposição constante aos agrotóxicos são abortos espontâneos, partos prematuros após exposição pré-natal, diminuição do tempo de gravidez (Abell et al., 2000; Idrovo et al., 2005; Bretveld et al., 2008), retardo de crescimento, alterações nos fetos, como orofaciais, musculoesqueléticos, defeito no tubo neural, criptorquidismo (Kristensen et al., 1997; Shaw et al., 1999; Levario-Carrillo, et al., 2004; Whyatt et al., 2004; Carbone et al., 2007; Petit, et al., 2010) e aumento no desenvolvimento de autismo em crianças (Roberts et al., 2007).

Estudo realizado por Cooper et al. (2006) demonstraram que a exposição de mães a inseticidas inibidores da enzima acetilcolinesterase no primeiro trimestre de gravidez aumenta um risco em 2,7 vezes, em relação a mães não expostas a esses inseticidas, de terem filhos com alguma malformação congênita.

Os agrotóxicos também podem atuar como interferentes endócrinos, de forma a modificar a homeostase hormonal em homens e mulheres e reduzir a fertilidade (Meyer et al., 1999; Bila e Dezotti, 2007).

Após a aplicação, os agrotóxicos podem ser transferidos constantemente dos ecossistemas terrestres para os aquáticos. Mesmo em concentrações aquáticas baixas nas águas, os agrotóxicos podem afetar a estrutura e funções

das comunidades naturais, e desencadear impactos negativos em múltiplos níveis de organização biológica (Grisolia, 2005; Bortoluzzi et al., 2006).

Rohr e McCoy (2010), em ampla revisão bibliográfica, citam que o herbicida atrazina causa efeitos ecológicos indiretos e adversos em peixes e anfíbios. Entre os efeitos descritos, destacam a redução do crescimento e do comportamento antipredador dos peixes, atividade locomotora elevada e imunidade reduzida, acompanhada por infecções elevadas. Os autores relatam também anormalidades morfológicas das gônadas associadas a alterações na produção de hormônios sexuais, o que evidencia que a atrazina pode ocasionar perturbações ao sistema endócrino.

Kreutz et al. (2010) observaram redução na resposta imunitária natural a bactérias e a outros microorganismos aquáticos do peixe *Rhamdia quelen* após a exposição a concentrações subletais de herbicidas à base de glifosato e atrazina. O herbicida glifosato também provoca estresse oxidativo (Lushchak et al., 2009) e danos histopatológicos hepáticos relacionados a alterações do perfil de expressão proteica em peixes de água doce (Ferreira et al., 2010; Dos Santos et al., 2017).

Em estudos realizados por Navarro-Martín et al. (2014) foram constatados efeitos negativos na metamorfose, na taxa de desenvolvimento e na sobrevivência de girinos de rãs (*Lithobates sylvaticus*), expostos cronicamente ao herbicida glifosato.

Em estudo com bagre *Clarias batrachus* foi constatado que o inseticida malation causou perturbações nas funções endócrinas do peixe e na sensação olfativa, responsável pela ingestão alimentar e pelo comportamento de alimentação gustativa. Essas alterações provocam redução no peso corporal e no crescimento do organismo (Lal et al. 2013).

A exposição por longo tempo ao herbicida terbutrina pode alterar significativamente os perfis bioquímicos e hematológicos dos peixes *Cyprinus carpio* L. Outros efeitos dessa exposição são alterações em órgãos internos dos animais, aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e inibição da capacidade antioxidante dos peixes (Velisek et al., 2011).

Em exposições subletais de girinos de rã-touro-americana (*Lithobates catesbeianus*) ao herbicida clomazone foi constatado o aumento no número de

centros melanomacrófagos, que é um indicativo de condições estressantes (Oliveira et al., 2016).

O comprometimento na resposta ao cortisol foi observado no bagre *Rhamdia quelen* exposto aos inseticidas à base de metilparation, fungicidas à base de tebuconazol, herbicidas à base de atrazina, simazina e glifosato. A inibição na produção de cortisol pelas glândulas suprarrenais pode dificultar seriamente a resposta adaptativa e a capacidade de promover os necessários ajustes metabólicos e iônicos para responder ao estresse ambiental (Koakoski et al., 2014).

Os efeitos de herbicidas no comportamento de peixes têm sido avaliados em diversos estudos. Bretaud et al. (2004) observaram que concentrações de 5.000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de paraquat não afetou as ações comportamentais de *D. rerio*. Em peixes da espécie *Carassius auratus*, expostos a 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ do herbicida diuron (mesmo grupo químico do herbicida tebutiuron) foi relatado à diminuição na atividade comportamental de agrupamento. Porém, nenhuma resposta comportamental foi observada quando os organismos foram transferidos para águas não contaminadas (Saglio e Trijasse, 1998).

Além da mensuração dos efeitos dos poluentes sobre o homem e ao ecossistema, esses estudos permitem ainda a obtenção de conhecimentos científicos e a formação de um banco de dados da mensuração da poluição ambiental, da capacidade de assimilação do meio e da compreensão dos processos naturais.

6. CONCLUSÕES

As águas de afluente e de tanque de peixes dos cinco pesque-pague, localizados em microbacias cultivadas com cana-de-açúcar nas regiões administrativas de Ribeirão Preto e Central, no Estado de São Paulo, período entre Junho/2014 e Maio/2015, estavam contaminadas, em ordem decrescente, com a cafeína e com os herbicidas tebutiuron, metolacoloro, hexazinona, atrazina, ametrina e clomazone.

As concentrações dos herbicidas foram maiores nas águas de afluente que nas do tanque de peixes dos pesque-pague.

As maiores concentrações dos herbicidas nas águas dos pesque-pague foram encontradas no período de amostragem em que ocorreram os maiores índices pluviométricos. Para a cafeína, as maiores concentrações nas águas dos pesque-pague foram encontradas no período de amostragem com menores índices pluviométricos.

A declividade baixa da microbacia e a mata ciliar, apesar de serem fatores relevantes para a magnitude da contaminação em corpos d'água, no presente estudo, não foram determinantes na contaminação das águas de afluente e de tanque de peixes dos pesque-pague com os herbicidas.

A maior porcentagem da área das microbacias, onde os pesque-pague estão inseridos, cultivada com cana-de-açúcar influenciou na maior concentração dos herbicidas nas águas dos afluentes e dos tanques de peixes, devido a maior quantidade aplicada na área e o manejo do solo.

Os sedimentos de fundo dos tanques de peixes dos pesque-pague estavam contaminados em ordem decrescente pelos herbicidas metolacoloro, tebutiuron, hexazinona e isoxaflutol.

As concentrações dos herbicidas e de cafeína nas águas dos pesque-pague não foram suficientes para causar intoxicação em *D. magna* e inibição do crescimento de frondes de *L. minor*.

A baixa concentração de nutrientes nas águas, a baixa condutividade elétrica e os altos valores de pH causaram inibição de crescimento das frondes de

L. minor. O crescimento das frondes de *L. minor* é proporcional à condutividade elétrica da água.

Entre os dois contaminantes prevalentes, a toxicidade aguda do tebutiuron é maior que a da cafeína para *D. magna*, *L. minor* e *O. niloticus*. O tebutiuron se classifica como extremamente tóxico e altamente tóxico apenas para a macrófita aquática *L. minor*.

O tebutiuron se classifica como de baixo risco de intoxicação ambiental para *D. magna* e *O. niloticus* e como de alto a médio risco de intoxicação ambiental para *L. minor*. Em função da diluição nas águas, é de baixo risco de intoxicação ambiental para *L. minor* nas diluições inferiores a 3,12% da maior dose de uso recomendada nos cenários de espelhos d'água com 2,0 m de profundidade, e inferiores a 6,25% com 3m de profundidade.

REFERÊNCIAS

- Abell, A., Juul, S., Bonde, J.P., 2000. Time to pregnancy among female greenhouse workers. *Scand. J. Work Environ. Health*. 26, 131-136.
- Alavanja, M.C.R., Bonner, M.R., 2012. Occupational Pesticide Exposures and Cancer Risk: A Review. *J. Toxicol. Environ. Health B*. 15, 238-263.
- Alavanja, M.C.R., Ross, M.K., Bonner, M.R., 2013. Increased Cancer Burden Among Pesticide Applicators and Others Due to Pesticide Exposure. *CA Cancer J. Clin.* 63, 120-142.
- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.* 27, 673–679.
- Alves-costa, J.R.M., 2001. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. 125p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Arauco, L.R.R., Cruz, C., Machado-Neto, J.G., 2005. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de daphnia. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. 15, 55-64.
- Arias, A.R.L., Buss, D.F., Albuquerque, C., Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M., Mugnai, R., Baptista, D.F., 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciênc. Saúde Coletiva*. 12, 61-72.
- Armas, E.D., Monteiro, R.T.R., Amâncio, A.V., Correa, R.M.L.E., Guercio, M.A., 2005. The use of pesticides in sugar cane at the Corumbataí river basin and the risk of water pollution. *Quím. Nova*. 28, 975-982.
- Armas, E.D., Monteiro, R.T.S., Antunes, P.M., Santos, M.A.P., 2007. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. *Quím. Nova*. 30, 1119-1127.
- Associação Brasileira De Normas Técnicas – ABNT, 1984. NBR 7181: Solo – Análise Granulométrica. Rio de Janeiro.
- Associação Brasileira De Normas Técnicas – ABNT, 1987. NBR 9898: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro.
- Associação Brasileira De Normas Técnicas – ABNT, 1997. NBR 13811: Água – Determinação de potássio e sódio – Método de espectrometria de absorção atômica por chama. Rio de Janeiro.
- Associação Brasileira De Normas Técnicas – ABNT, 2003. NBR 13073: Limpeza de vidrarias para uso em ensaios de produtos agrotóxicos e afins. Rio de Janeiro.
- Associação Brasileira De Normas Técnicas – ABNT, 2009. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro.

Associação Brasileira De Normas Técnicas – ABNT, 2015. NBR 15499: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro.

Belay, A., Ture, K., Redi, M., Asfaw, A., 2008. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chem.* 108, 310-315.

Bicalho, S.T.T., Langenbach, T., 2013. The fate of tebuthiuron in microcosm with riparian forest seedlings. *Geoderma.* 207-208, 66-70.

Bila, D. M., Dezotti, M., 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quím. Nova.* 30, 651-666.

Bini, L.M., Thomaz, S.M., Murphy, K. J., Camargo, A.F.M., 1999. Aquatic macrophyte distribution in relation to water and sediment conditions in the Itaipu Reservoir, Brazil. *Hydrobiologia.* 415, 147-154.

Biudes, J.F.V., Camargo, A.F.M., 2008. Estudos dos fatores limitantes à produção primária por macrófitas aquáticas no Brasil. *Oecol. Bras.* 12, 7-19.

Bortoluzzi, E.C., Rheinheimer, D.S., Gonçalves, C.S., Pellegrini, J.B.R., Zanella, R., Copetti, A.C.C., 2006. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 10, 881-887.

Botelho, R.G., Santos, J.B., Oliveira, T.A., Braga, R.R., Byrro, E.C.M., 2009. Toxicidade aguda de herbicidas a tilápia (*Oreochromis niloticus*). *Planta Daninha.* 27, 621-626.

Braccini, M.C.L., Braccini, A.L.E., Martinez, H.E.P., 1999. Critérios para renovação ou manutenção de solução nutritiva em cultivo hidropônico. *Semina: Ci. Agr.* 20, 48-58.

Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário. Disponível em <http://cidades.ibge.gov.br/v3/cidades/municipio/3524303> (acesso 10.12.2016).

Bretaud, S., Lee, S., Guo, S., 2004. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotox. Teratolog.* 26, 857–864.

Bretveld, R.W., Hooiveld, M., Zielhuis, G.A., Pellegrino, A., Van Rooij, I.A.L.M., Roeleveld, N., 2008. Reproductive disorders among male and female greenhouse workers. *Reprod. Toxicol.* 25, 107-114.

Brito, P.F., Gomide, M., Câmara, V.M., 2009. Agrotóxico e saúde: realidade e desafios para mudanças de prática na agricultura. *Physis Revista de Saúde Coletiva.* 19, 207-225.

Britto, F.B., Vasco, A.N., Pereira, A.P.S., Mello, A.V., Nogueira, L.C., 2012. Herbicides in the upper Poxim River, Sergipe, and the risk of contamination of water resources. *Rev. Ciênc. Agron.* 43, 390-398.

Buratini, S.V., Bertoletti, E., Zagatto, P.A., 2004. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 878-882.

Burns, C.J., 2005. Cancer among pesticide manufacturers and applicators. *Scand. J. Work Environ. Health.* 31, 9-17.

Caleffi, G.H., 2005. **Resíduos organoclorados em sangue, leite materno e tecido adiposo humanos em regiões definidas do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** 149p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Camargo, A.F.M., Pezzato, M.M., Henry-Silva, G.G., 2003. Fatores limitantes à produção primária de macrófitas aquáticas, in: Thomaz, S.M., Bibi, L.M. (Eds.), *Ecologias e manejo de macrófitas aquáticas*. EDUEM, Maringá, pp.319-341.

Canela, M.C., Jardim, W.F., Sodré, F.F., Grassi, M.T., 2014. Cafeína em  guas de abastecimento público no Brasil, in: Canela, M.C., Jardim, W.F., Sodré, F.F., Grassi, M.T. (Eds.). Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas – INCTAA, Editora Cubo, São Carlos, 96p.

Capolupo, M., Valbonesi, P., Kiwan, A., Buratti, S., Franzellitti, S., Fabbri, E., 2016. Use of an integrated biomarker-based strategy to evaluate physiological stress responses induced by environmental concentrations of caffeine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Sci. Total Environ.* 536-564, 538-548.

Carbonari, C.A., 2009. **Efeito da palha na disponibilidade do herbicida amicarbazone na soluço do solo em áreas cultivadas com cana-de-a car.** 101p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agron micas de Botucatu, Botucatu.

Carbone, P., Giordano, F., Nori, F., Mantovani, A., Taruscio, D., Lauria, L., Fig -Talamanca, I., 2007. The possible role of endocrine disrupting chemicals in the aetiology of cryptorchidism and hypospadias: a population-based case-control study in rural Sicily. *Int. J. Androl.* 30, 3-13.

CAS: 58-08-2, OECD SIDS., 2002. Caffeine, UNEP Publications, Paris.

Celis, R., Hermos n, M.C., Carrizosa, J., Cornejo, J., 2002. Inorganic and organic clays as carriers for controlled release of the herbicide hexazinone. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2324-2330.

Chen, Y.H., Huang, Y.H., Wen, C.C., Wang, Y.H., Chen, W.L., Chen, L.C., Tsay, H.J., 2008. Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicol. Teratol.* 30, 440-447.

Christoffoleti, P.J., Ovejero, R.F.L., Damin, V., Carvalho, S.J.P., Nicolai, M., 2008. Comportamento dos herbicidas aplicados ao solo na cultura de cana-de-a car, in: Christoffoleti, P.J., Ovejero, R.F.L. (Eds.), Piracicaba, pp. 9-85.

Companhia De Tecnologia De Saneamento Ambiental – CETESB, 2011. Guia Nacional de Coletas e Preserva o de Amostras-  gua, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Brasília.

Companhia De Tecnologia De Saneamento Ambiental – CETESB, 2015. Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo 2014. <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/32/2013/11/agua-doce-parte1-corrigido.pdf>. (acesso 16.11.2015).

Companhia Nacional De Abastecimento – CONAB, 2015. Indicadores da Agropecuária. <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1522&t=2?a=1532&t=2>. (acesso 18.08.2015).

Cooper, W.O., Hernandez-Diaz, S., Arbogast, P.G., Dudley, J.A., Dyer, S., Gideon, P.S., Hall, K., Ray, W.A., 2006. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 354, 2443-2451.

Correia, F.V., Langenbach, T., 2006. Dinâmica da distribuição e degradação de atrazina em Argissolo vermelho-amarelo sob condições de clima tropical úmido. *R. Bras. Ci. Solo*, 30, 183-192.

Correia, N.M., Braz, B.A., Fuzita, W.E., 2010. Eficácia de herbicidas aplicados nas épocas seca e úmida para o controle de *Merremia aegyptia* na cultura da cana-de-açúcar. *Planta Daninha*. 28, 631-642.

Costa, C.N., Meurer, E.J., Bissani, C.A., Selbach, P.A., 2004. Contaminantes e poluentes do solo e do ambiente, in: Meurer, E. J. (Ed.), *Fundamentos de química do solo*. Gênese, Porto Alegre, pp.207-237.

Costa, C.R., Olivi, P., Botta, C.M.R., Espindola, E.L.G., 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quím. Nova*. 31, 1820-1830.

Coutris, C., Merlina, G., Silvestre, J., Pinelli, E., Elger, A., 2011. Can we predict community-wide effects of herbicides from toxicity tests on macrophyte species? *Aquat Toxicol.* 101, 49-56.

Cruz, C., Silva, A.F., Shiogiri, N.S., Garlich, N., Pitelli, R.A., 2015. Imazapyr herbicide efficacy on floating macrophyte control and ecotoxicology for non-target organisms. *Planta Daninha*. 33, 103-108.

Daam, M.A., Pereira, A.C.S., Silva, E., Caetano, L., Cerejeira, M.J., 2013. Preliminary aquatic risk assessment of imidacloprid after application in an experimental rice plot. *Ecotox. Environ. Safe*, 97, 78-85.

De Maria, C.A.B., Moreira, R.F.A., 2007. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. *Quím. Nova*. 30, 99-105.

Devillers, J., Mombelli, E., Samsera, R., 2011. Structural alerts for estimating the carcinogenicity of pesticides and biocides. *SAR QSAR Environ. Res.* 22, 89-106.

Di Bernardo Dantas, A., Paschoalato, C.F.R., Martinez, M.S., Ballejo, R.R., Di Bernardo, L., 2011. Removal of diuron and hexazinone from Guarany Aquifer groundwater. *Braz. J. Chem. Eng.* 28, 415-424.

Dias, D.C., Maiorino, F.C., Ranzani-Paiva, M.J.T., Ishikawa, N.M., Lombardi, J.V., Ferreira, J.R., França, F.M., Ferreira, C.M., 2007. Avaliação Histopatológica do Baço, Coração e Encéfalo De Tilápia *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) Exposta ao Cloreto de Mercúrio. *Boletim do Instituto de Pesca*. 33, 213-220.

Diogo, J.S.G., Silva, L.S.O., Pena, A., Lino, C.M., 2013. Risk assessment of additives through soft drinks and nectars consumption on Portuguese population: a 2010 survey. *Food Chem. Toxicol.* 62, 548-553.

Domingues, D.F., Bertolotti, E., 2006. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos, in: Zagato, P.A., Bertolotti, E. (Eds.), *Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações*. RiMa, São Carlos, pp. 153–184.

Dores, E.F.G.C., Carbo, L. Ribeiro, M.L., De-Lamonica-Freire, E., 2008. Pesticide levels in ground and surface waters of Primavera do Leste region, Mato Grosso, Brazil. *J. Chromatogr. Sci.* 46, 585-590.

Dores, E.F.G.C., Spadotto, C.A., Weber, O.L.S., Carbo, L., Vecchiato, A.B., Pinto, A.A., 2009. Environmental behaviour of metolachlor and diuron in a tropical soil in the central region of Brazil. *Water Air Soil Pollut.* 197, 175-183.

Dos Santos, A.P.R., Rocha, T.L., Borges, C.L., Bailão, A.M., Soares, C.M.A, Sabóia-Morais, S.M.T., 2017. A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*, 168, 933-943.

Dousset, S., Chauvin, C., Durllet, P., Thévenot, M., 2004. Transfer of hexazinone and glyphosate through undisturbed soil columns in soils under Christmas tree cultivation. *Chemosphere*. 57, 265-272.

Embrapa, 1997. Manual de Métodos de Análise de Solos. 2º ed. Revista e atualizada – Rio de Janeiro, 212p.

Embrapa, 2006. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2º ed. Rio de Janeiro, 306p.

Exttoxnet - Extension Toxicology Network. Tebuthiuron. <http://exttoxnet.orst.edu/pips/tebuthiu.htm> (acesso 27.12.16).

Ferreira D., Motta A.C., Kreutz L.C., Toni C., Loro V.L., Barcellos L.J.G., 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*. 79, 914-921.

Ferreira, A.P., Arouca, S., 2005. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. *Cad. Saúde Pública*. 21, 1884-1892.

Firmino, L.E., Tuffi Santos, L.D., Ferreira, L.R., Ferreira, F.A., Quirino, A.L.S., 2008. Movimento do herbicida imazapyr no perfil de solos tropicais. *Planta Daninha*. 26, 223-230.

Frary, C.D., Johnson, R.K., Wang, M.Q., 2005. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *J. Am. Diet. Assoc.* 105, 110-113.

Froehner, S., Machado, K.S., Falcão, F., Monnich, C., Bessa, M., 2011. Inputs of domestic and industrial sewage in Upper Iguassu, Brazil identified by emerging compounds. *Water Air Soil Pollut.* 215, 251-259.

Gatidou, G., Stasinakis, A.S., Iatrou, E.I., 2015. Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Chemosphere*. 119, S69-S74.

Genevière, M.C., Duthie, H.C., Taylor, W.D., 1997. Models of aquatic plant productivity: a review of the factors that influence growth. *Aquat. Bot.* 59, 195-215.

Gfrerer, M., Wenzl, T., Quan, X., Platzer, B., Lankmayr, E., 2002. Occurrence of triazines in surface and drinking water of Liaoning Province in Eastern China. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 35, 217-228.

Ghiselli, G., 2006 **Ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 190p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Girón-Pérez, M.I., Santerre, A., Gonzalez-Jaime, F., Casas-Solis, J., Hernández-Coronado, M., Peregrina-Sandoval, J., Takemura, A., Zaitseva, G., 2007.

Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish Shellfish Immun.* 23, 760-769.

Goktepe, I., Portier, R., Ahmedna, M., 2004. Ecological risk assessment of Neem-based pesticides. *J. Environ. Sci. Health B.* 39, 311-320.

Gomes, M.A.F., Spadotto, C.A., Lanchotte, V.L., 2001. Ocorrência do herbicida tebutiuron na água subterrânea da microbacia do Córrego Espreado, Ribeirão Preto – SP. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente.* 11, 65-76.

Gomes, M.A.F., Spadotto, C.A., Pereira, A.S., Matallo, M.B., Luchini, L.C., 2006. Movimento do herbicida tebutiuron em dois solos representativos das áreas de recarga do aquífero Guarani. *Rev. Bras. Eng. Agríc. e Ambient.* 10, 479-483

Gonçalves, E.S., 2008. **Uso da cafeína como indicador de contaminação por esgoto doméstico em águas superficiais.** 90p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense, Niterói.

Grisolia, C.K., 2005. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução, in: Grisolia, C.K. (Ed.). UNB, Brasília, 392p.

Grützmacher, D.D., Grützmacher, A.D., Agostinetto, D., Loeck, A.E., Roman, R., Peixoto, S.C., Zanella, R., 2008. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. *Rev. Bras. Eng. Agríc. e Ambient.* 12, 632-637.

Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, V., 1977. Trimed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 7, 714-719.

Harper, S., 1994. Sorption-desorption and herbicide behavior in soil. *Weed Sci.* 6, 207-225.

Hayasaka, D., Korenaga, T., Suzuki, K., Sánchez-Bayo, F., Goka, K., 2012. Differences in susceptibility of five cladoceran species to two systemic insecticides, imidacloprid and fipronil. *Ecotoxicology.* 21, 421-427.

Henares, M.N.P., Cruz, C., Gomes, G.R., Pitelli, R.A., Machado, M.R.F., 2008. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci. Biol. Sci.* 30, 77-82.

Henrique, F.L., Brentano, D.M., 2010. Avaliação da toxicidade aguda da água do rio Papaquara, município de Florianópolis/SC, utilizando o organismo-teste *Daphnia magna*. *Revista Técnico-Científica.* 2, 71-75.

Herricks, E., 2002. Princípios gerais de toxicologia, in: Matsui, S., Barrett, B.F.D., Banerjee, J. (Eds.), Gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios. (Série: Diretrizes para o gerenciamento de lagos), ILEC – IIE, São Carlos, pp.9-30.

Hilsdorf, A.W.S., 2007. Avaliação genética e zootécnica de duas variedades de tilápia nilótica (*O. niloticus* var. red-stirling e *O. niloticus* var. chilatrada) para o estabelecimento de um programa de produção massal de um híbrido de tilápia vermelha. <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/217/avaliacao-genetica-zootecnica-duas-variedades> (acesso 01.10.15).

Hinkle D.E., Wiersma W, Jurs S.G., 2003. Applied Statistics for the Behavioral Sciences. 5th ed. Houghton Mifflin, Boston.

Holvoet, K.M.A., Seuntjens, P., Vanrolleghem, P.A., 2007. Monitoring and modeling pesticide fate in surface waters at the catchment scale. *Ecol. Model.*, 209, 53-64.

Hongzhi, H., Jing, Y., Guikiu, C., Wenyang, L., Jinbo, H., Huashou, L., 2012. Acute toxicity of butachlor and atrazine to freshwater green alga *Scenedesmus obliquus* and cladoceran *Daphnia carinata*. *Ecotox. Environ. Safe.* 80, 91-96.

Hwang H., Alegre, G.F., Borrely, S.I., Flynn, M.N., 2009. Avaliação de toxicidade em sedimentos do rio Juqueri (SP) com *Vibrio fischeri* e *Hyaella Azteca*. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade.* 2, 18-28.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2015. Sistema de classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental – PPA. http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/classificacao_ppa (acesso 20.06.16).

Idrovo, A.J., Sanin, L.H., Cole, D., Chavarro, J., Cáceres, H., Narváez, J., Restrepo, M., 2005. Time to first pregnancy among women working in agricultural production. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 78, 493-500.

Inácio, A.P., Martins, D., Silva, L., Cardoso, R., Fonseca, V., 2010. Fatores condicionantes da reprodução em *Daphnia magna*. *Captar.* 2, 55-66.

Iseki, K.K., Costa, T.D., Salles, H.C., Gouveia, G.R., Martins, C.M., Carrara, J.A., Negrão, J.A., 2012. Toxicidade aguda do herbicida ametrina para alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Ensaio e Ciência.* 16, 77-84.

Jacomini, A.E., Camargo, P.B., Avelar, W.E.P., Bonato, P.S., 2011. Assessment of ametryn contamination in river water, river sediment, and mollusk bivalves in São Paulo State, Brazil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 452-461.

Jardim, W.F., Canela, M.C., 2012. Cafeína na água para consumo humano. <http://veja.abril.com.br/saude/agua-de-15-capitais-tem-sinal-de-contaminacao-diz-estudo/> (acesso 21.12.16).

Kirk, J.T.O., 2010. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems, in: Kirk, J.T.O. (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge. 649p.

Kiss, I., Kováts, N., Szalay, T., 2003. Evaluation of some alternative guideline for risk assessment of various habitats. *Toxicol. Lett.* 140-141, 411-417.

Koakoski, G., Quevedo, R.M., Ferreira, D., Oliveira, T.A., Rosa, J.G.S., Abreu, M.S., Gusso, D., Marqueze, A., Kreutz, L.C., Giacomini, A.C.V., Fagundes, M., Barcellos, L.J.G., 2014. Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. *Chemosphere.* 112, 85-91.

Kogan, M.A., Pérez, J.A., 2004. Herbicidas: fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. *Ciência e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencia de la agricultura.* 31, 213.

Kouzayha, A., Rabaa, A.R., Iskandarani, M.A., Beh, D., Budzinski, H., Jaber, F., 2012. Multiresidue method for determination of 67 pesticides in water sample using solid-phase extraction with centrifugation and gas chromatography-mass spectrometry. *Am. J. of Analyt. Chem.* 3, 257-265.

Krauss, T., Braga, A.M.C.B., Rosa, J.M., Kypke, K., Malisch, R., 2004. Levels of organochlorine in Brazilian human Milk. *Organohalogen Compounds*. 66, 2773-2777.

Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Marteninghe, A., Santos, E.D., Zanatta, R., 2010. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shellfish Immun.* 29, 694-697.

Kristensen, P., Irgens, L.M., Andersen, A., BYE, A.S., Sundheim, L., 1997. Birth Defects among Offspring of Norwegian Farmers, 1967-1991. *Epidemiology*. 8, 537-544.

Kurissery S, Kanavillil N, Verenitch S, Mazumder A., 2012. Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed. *Ecol. Indic.* 23, 501–508.

Lal, B., Sarang, M.K., Kumar, P., 2013. Malathion exposure induces the endocrine disruption and growth retardation in the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *Gen. Comp. Endocr.* 181, 139-145.

Larcher, W., 2000. *Ecofisiologia vegetal*. RiMa, São Carlos.

Levario-Carrillo, M., Amato, D., Ostrosky-Wegman, P., González-Horta, C., Corona, Y., Sanin, L.H., 2004. Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere*. 55, 1421-1427.

Lombardi, J.V., 2015. *Fundamentos de toxicologia aquática*. http://www.aquicultura.br/conceitos_fundamentais.htm (acesso 29.11.2015).

Luís, P.G., 2004. **Inserção de sítios reativos de matéria orgânica no solo: uma proposta para tratamento de solos contaminados com tebuthiuron**. 107p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Lushchak O.V., Kubrak O.I., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I., 2009. Low toxicity herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*. 76, 932-937.

Magalhães, D.P., Filho, A.S.F., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* 12, 355-381.

Manrique, W.G., Figueiredo, M.A.P., Machado-Neto, J.G., 2013. Dissipation and environmental risk of fipronil on aquatic environment. *Biologist (Lima)*. 11, 107-117.

Mariot, E., Webwe, O.L.S., Spadotto, C.A., Dores, E.F.G.C., 2009. Uso do índice LIX na previsão de lixiviação dos pesticidas metolaclo, endossulfam, clorpirifós, carbendazim e diurom. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. 19, 57-64.

Marques, M.N., Cotrim, M.B., Pires, M.A.F., Filho, O.B., 2007. Avaliação do impacto da agricultura em áreas de produção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguapé, São Paulo. *Quím. Nova*. 30, 1171-1178.

Martini, E., Barbosa, M.L.D., Depin, M.H., Alquini, F., Oenning, A.F.P., 2015. Revisão de literatura sobre a presença de etinilestradiol e cafeína na água potável e seus efeitos sobre o organismo humano. *Novos Saberes*. 2, 58-69.

- Martins, J., Teles, O., Vasconcelos, V., 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ. Internat.* 33, 414-425.
- Matuo, Y.K., Lopes, J.N.C., Casanova, I.C., Matuo, T., Lopes, J.L.C., 1992. Organochlorine pesticide residues in human milk in the Ribeirão Preto Region, State of São Paulo, Brazil. *Arch. Environ. Con. Tox.* 22, 167-175.
- Melo, V.F., Castilhos, R.M.V., Pinto, L.F.S., 2009. Reserva Mineral do Solo. Química e Mineralogia do Solo, Parte II, in: Alleoni, L.R.F., Melo, V.F. (Eds.). SBCS, Viçosa, 252p.
- Mendes, K.F., Goulart, B.F., Possamai, A.C.S., Inoue, M.H., Matos, A.K.A., Tschope, M.C., 2013. Lixiviação do hexazinone e da mistura hexazinone+diuron em colunas de solos com texturas distintas. *Revista Agro@ambiente On-line.* 7, 218-224.
- Mesquita, A.S., 2001. **Avaliação da contaminação do leite materno por agrotóxicos organoclorados persistentes em mulheres doadoras do Banco de leite do Instituto Fernandes Figueira, RJ.** 68p. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Meyer, A., Sarcinelli, P.N., Moreira, J.C., 1999. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? *Caderno de Saúde Pública.* 14, 845-850.
- Milhome, M.A.L., Sousa, D.O.B., Lima, F.A.F., Nascimento, R.F., 2009. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. *Eng. Sanit. Ambient.* 14, 363-372.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2015. Cana-de-açúcar. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar> (acesso 10.10.2015).
- Montagner, C.C., Jardim, W.F., 2011. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia river, São Paulo State (Brazil). *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 1452-1462.
- Montagner, C.C., Umbuzeiro, G.A., Pasquini, C., Jardim, W.F., 2014. Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source waters. *Env. Sci. Process. Impact.* 16, 1866-1869.
- Montague, B. 2000. Onliner Pesticide Toxicity Database. USEPA.
- Monteiro, R.T.R., 1996. Biodegradação de herbicidas, in: EMBRAPA – CNPMA. Workshop sobre biodegradação, Campinas, pp.120-128.
- Moore, M.T., Greenway, S.L., Farris, J.L., Guerra, B., 2008. Assessing caffeine as an emerging environmental concern using conventional approaches. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 31–35.
- Moreira, J.C., Peres, F., Pignati, W.A., Dores, E.F.G.C., 2010. Avaliação do risco à saúde humana decorrente do uso de agrotóxicos na agricultura e pecuária na Região Centro-Oeste. Relatório de Pesquisa. Brasília. CNPq 555193/2006-3.
- Moreira, J.C., Peres, F., Simões, A.C., Pignati, W.A., Dores, E.C., Vieira, S.N., Strüssmann, C, Mott, T., 2012. Contaminação de águas superficiais e de chuva

por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. *Ciênc. Saúde Coletiva*. 17, 1557-1568.

Moreira, R.A., Mansano, A.S., Silva, L.C., Rocha, O., 2014. Comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. *Acta Limnol. Bras.* 26, 1-8.

Moura, E.E.S., 2009. **Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes**. 58p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Nakagome, F.K., Noldin, J.A., Júnior, C.R., 2006. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. 16, 93-100.

Nakagome, F.K., Noldin, J.A., Resgalla Jr. C., 2007. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. 17, 117-122.

Navarro-Martín, L., Lanctôt, C., Jackman, P., Park, B.J., Doe, K., Pauli, B.D., Trudeau, V.L., 2014. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: Chronic laboratory exposures to VisionMax®. *Aquat. Toxicol.* 154, 278-290.

Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., Feeley, M., 2003 Effects of caffeine on human health. *Food Addit. Contam.* 20, 1-30.

Noldin, J.A., Hermes, L.C., Fay, E.F., Eberhardt, D.S., Rossi, M.A., 2001. Persistência do herbicida clomazone no solo e na água quando aplicado na cultura do arroz irrigado, sistema pré-germinado. *Planta Daninha*. 19, 401-408.

Nunes, M.V., Tajara, E.H., 1998. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. *Revista de Saúde Pública*. 32, 372-383.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development., 2002. *Lemna sp.* Growth Inhibition Test, in: GUIDELINE for testing of chemicals.

Oliveira, C.R., Fraceto, L.F., Rizzi, G.M., Salla, R.F., Abdalla, F.C., Costa, M.J., Silva-Zacarin, E.C.M., 2016. Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*. 149, 304-313.

Oliveira, M.F., Brighenti, A.M., 2011. Comportamento dos Herbicidas no Ambiente, in: Oliveira, R.S.JR., Constantin, J., Inoue, M.H. (Eds.), *Biologia e Manejo de plantas daninhas*. Omnipaz Editora Ltda, pp.263-304.

Palma, D.C.A., 2011. **Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde MT**. 103p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.

Pandey, M.R., Guo, H., 2015. Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of Insecticide Carbaryl to Flounder Gill Cells and Its Teratogenicity to Zebrafish Embryos. *J. Ocean Univ. China*. 14, 362-374.

Parker, R.D., Jones, R.D., Nelson, H.P., 1995. GENEEC: A screening model for pesticide environmental exposure assessment, in: *International Exposure*

Symposium on Water Quality Modeling. American Society of Agricultural Engineers, Orlando, pp. 485-490.

Passos, A.B.R.J., 2011. **Sorção, dessorção e lixiviação do sulfentrazone em diferentes solos brasileiros**. 50p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Paula, R.T., 2007. **Mobilidade de atrazine e ametryn em Latossolo Vermelho-Amarelo**. 105p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Peres, F., Moreira, J.C., Dubois, G.S., 2003. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. É veneno ou é remédio. 21-41.

Pessoa, M.C.P.Y., Gomes, M.A.F., Neves, M.C., Cerdeira, A.L., Souza, M.D., 2003. Identificação de áreas de exposição ao risco de contaminação de águas subterrâneas pelos herbicidas atrazina, diuron e tebutiuron. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente. 13, 111-122.

Petit, C., Chevrier, C., Durand, G., Monfort, C., Rouget, F., Garlantezec, R., Cordier, S., 2010. Impact on fetal growth of prenatal exposure to pesticides due to agricultural activities: a prospective cohort study in Brittany, France. Environ. Health. 9,1-12.

Pezzato, M.M., 2007. **Macrófitas aquáticas submersas: fotossíntese, crescimento e variáveis abióticas da água**. 136p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Pierini, S.A., Thomaz, S., 2004. Effects of inorganic carbon source on photosynthetic rates of *Egeria najas Planchon* and *Egeria densa Planchon* (Hydrocharitaceae). Aquatic Bot. 78, 135-146.

Pihlström, T., 2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document n° SANCO/12495/2011, 41p.

Pinheiro, M.N.M., Hortêncio, M.M., Evangelista, R.A.O., 2012. Distribuição espacial da biodiversidade de macrófitas aquáticas nos lagos da região Nordeste do Estado de Roraima. Revista Geonorte. 1, 162-174.

Possavatz, J., Zeilhofer, P., Pinto, A.A., Tives, A.L., Dores, E.F.G.C., 2014. Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Rev. Ambient. Água. 9, 83-96.

Procópio, S.O., Silva, A.A., Vargas, L., 2008. Manejo e controle de plantas daninhas em cana-de-açúcar, in: Vargas, L., Roman, E.S. (Eds.), Manual de manejo e controle de plantas daninhas. Embrapa Trigo, Passo Fundo, pp.780.

Queiroz, S.C.N., Ferracini, V.L., Gomes, M.A.F., Rosa, M. A., 2009. Comportamento do herbicida hexazinone em área de recarga do aquífero Guarani cultivada com cana-de-açúcar. Quim. Nova. 32, 378-381.

Raimundo, C.C.M., 2011. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: ocorrência, sazonalidade e atividade estrogênica**. 204p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Rebello, R.M., Caldas, E.D., 2014. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. Quím. Nova. 37, 1199-1208.

Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova.* 27, 771-780.

Ribas, P.P., Matsumura, A.T.S., 2009. A química dos agrotóxicos: impactos sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato.* 10, 149-158.

Ribeiro, M.L., Lourencetti, C., Pereira, S.Y., Marchi, M.R.R., 2007. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. *Quím. Nova.* 30, 688-694.

Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D., Clesceri, L.S., 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd Ed. Maryland: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.

Roberts, E.M., English, P.B., Grether, J.K., Windham, G.C., Somberg, L., Wolff, C., 2007. Maternal Residence Near Agricultural Pesticide Applications and Autism Spectrum Disorders among Children in the California Central Valley. *Environ. Health Persp.* 115, 1482-1489.

Rodrigues, B.N., Almeida, F.S., 2005. Guia de herbicidas, in: Rodrigues, B.N., Almeida, F.S. (Eds.). 5.ed., Edição dos autores, Londrina, Paraná, 648p.

Rohr, J.R., McCoy, K.A., 2010. A Qualitative Meta-Analysis Reveals Consistent Effects of Atrazine on Freshwater Fish and Amphibians. *Environ. Health Persp.* 118, 20-32.

Russel, J.B., 1994. *Química Geral*, Vol.1, 2ª Ed. Makron Books, São Paulo.

Russom, C.L., Bradbury, S.P., Broderius, S.J., Hammermeister, D.E., Drummond, R.A., 1997. Predicting modes of toxic action from chemical structure: acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 948–967.

Saglio, P., Trijasse, S., 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 484–491.

Salisbury, F., Ross, C., 1992. *Plant Physiology*, in: Salisbury, F., Ross, C. (Eds.), Wadsworth Publishing Company, Belmont-California, 925p.

Sanchez, L.E., 2013. Avaliação de impacto ambiental: conceitos e métodos, in: Sánchez, L.E. (Ed.). *Oficina de Textos*, São Paulo, 584p.

Sangchan, W, Bannwarth, M., Ingwersen, J., Huginschmidt, C., Schwadorf, K., Thavornytikarn, P., Pansombat, K., Streck, T., 2014. Monitoring and risk assessment of pesticides in a tropical river of an agricultural watershed in northern Thailand. *Environ. Monit. Assess.* 86, 1083-1099.

Santos, E.A., 2013. **Contaminação por herbicidas em corpos hídricos da microbacia do Córrego Rico (SP) e aspectos toxicológicos de Atrazine a juvenis de *Piaractus mesopotamicus*.** 96p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Sarigul, Z., Bekcan, S., 2009. Acute toxicity of the herbicide glyphosate on *Daphnia magna*. *J. Agr. Sci.* 15, 204-208.

Schreiber, F., 2012. **Volatilização de clomazone e ocorrência de agrotóxicos e hormônios esteroides na água potável e da chuva de regiões orizícolas do**

Sul do Brasil. 113p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Schwab, A.P., Splichal, P.A., Banks, M.K., 2006. Persistence of atrazine and alachlor in ground water aquifers and soil. *Water Air Soil Poll.* 171, 203-235.

Shaw, G.M., Wasserman, C.R., O'Malley, C.D., Nelson, V., Jackson, R.J., 1999. Maternal Pesticide Exposure from Multiple Sources and Selected Congenital Anomalies. *Epidemiology.* 10, 60-66.

Silva, A.F., Cruz, C., Neto, A.N., Pitelli, R.A., 2012a. Ecotoxicidade de herbicidas para a macrófita aquática (*Azolla caroliniana*). *Planta Daninha.* 30, 541-546.

Silva, B.M., Paschoalato, C.F.P.R., Afonso, M.M.F., Souza, M.B., 2013a. Toxicidade aguda de herbicida e de seus componentes químicos diuron e hexazinona em *Ceriodaphnia dubia*. *Revista Eletrônica de Engenharia Civil.* 7, 23-35.

Silva, I.L.A., 2006. **Monitoração de pesticidas em ambientes de intensa atividade agrícola da região do Norte Fluminense.** 42p. Monografia - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

Silva, K.C., Silva, V.N.B., Sofiatti, V., Zonta, J.H., Lima, R.L.S., Silva, H., 2012b. Tolerância de mamoneira ao herbicida pendimethalin em solos com diferentes capacidades de adsorção. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 16, 1298– 1304.

Silva, M.R., Campos, A.C.E., Bohm, F.Z., 2013b. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *Saúde e Biologia.* 8, 46-58.

Sindicato Nacional da Indústria De Produtos Para Defesa Agrícola (SINDIVEG), 2016. <http://www.sindiveg.org.br/> (acesso em 19.04.2016).

Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), 2015. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons (acesso 29.08.2015).

Soares, A.F.S., Leão, M.M.D., Faria, V.H.F.F., Costa, M.C.M, Moura A.C.M., Ramos, V.D.V., Neto, M.R.V., Costa, E.P., 2013. Occurrence of pesticides from coffee crops in surface water. *Rev. Ambient. Água.* 8, 62-72.

Sodré F.F., Locatelli M.A.F., Jardim W.F., 2010b. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water Air Soil Poll.* 206, 57-67.

Sodré F.F., Pescara I.C., Montagner C.C., Jardim W.F., 2010a. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchem. J.* 96, 92-98.

Sodré, F.F., Montagner, C.C., Locatelli, M.A.F., Jardim, W.F., 2007. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 2, 187-196.

Solomon, K.R.; Dalhoff, K.; Volz, D.; Kraak, G.V.D., 2014. Effects of herbicides on fish. *Organic Chemical Toxicology of Fishes.* 33, 369-409.

Sousa, R.O., Vahl, L.C., Otero, X.L., 2009. Química de solo alagado, in: Melo, V.F., Alleoni, L.R.F. (Eds.), *Química e Mineralogia do Solo. Parte II – Aplicações.* Viçosa, MG, pp. 485-528.

Souza, D.N.R., Mozeto, A.A., Carneiro, R.L., Fadini, P.S., 2014. Electrical conductivity and emerging contaminant as markers of surface freshwater contamination by wastewater. *Sci. Total Environ.* 484,19-26.

Souza, J.P., 2008. **Toxicidade aguda e risco ambiental do Diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento.** 78p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Jaboticabal.

Spadotto, C.A., 2006a. Influência das condições meteorológicas no transporte de agrotóxicos no ambiente. Embrapa Meio Ambiente, Boletim SBMET. 15-20.

Spadotto, C.A., 2006b. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. *Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar.* 1-9.

Spadotto, C.A., Gomes, M.A.F., Luchini, L.C., Andréa, M.M., 2004. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente. 8-29.

Spongber, A.L., Witter, J.D., Acuña, J., Vargas, J., Murillo, M., Umaña, G., Gómez, E., Perez, G., 2011. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface Waters. *Water Res.* 45, 6709-6717.

Steffen, G.P.K., Steffen, R.B., Antonioli, Z.I., 2011. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. *Tecnológica.* 15, 15-21.

Stephenson, G.R., Solomon, K.R., 2007. *Pesticides and the Environment.* Canadian Network of Toxicology Centres Press Guelph, Ontario, Canadá.

Tabou, T.T., Baya, D.T., Eyul'anki, D.M., Vasel, J.L., 2014. Monitoring the influence of light intensity on the growth and mortality of duckweed (*Lemna minor*) through digital images processing. *Biotechnology, Agronomy, Social, Environmental.* 18, 37-48.

Tatarazako, N., Oda, S., Watanabe, H., Morita, M., Igushi, T., 2003. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere.* 53, 827-833.

Tavares, L.H.S., Rocha, O., 2002. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos, in: Tavares, L.H.S., Rocha, O. (Eds.). RiMa, São Carlos, 122p.

Thomaz, S.M., 2002. Fatores ecológicos associados à colonização e ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas e desafios de manejo. *Planta Daninha.* 20, 21-33.

Thomaz, S.M., Souza, D.C., Bini, L.M., 2003. Species richness and beta diversity of aquatic macrophytes in a large subtropical reservoir (Itaipu Reservoir, Brazil): the influence of limnology and morphometry. *Hydrobiologia.* 505, 119-128.

Traguetta, D.G., Vaz, C.M.P., Machado, S.A.S., Crestana, S., Vieira, E.M., Martin-Neto, L., 1996. Mecanismos de sorção da atrazina em solos: estudos espectroscópicos e polarográficos. *Embrapa.* 14, 1-7.

Tundisi, J.G., Tundisi, T.M., 2008. Limnologia, in: Tundisi, J.G., Tundisi, T.M. (Eds.). *Oficina de Textos*, São Paulo, 631p.

União da Indústria de Cana-de-Açúcar – (UNICA), 2015. Área plantada com cana-de-açúcar. <http://www.unicadata.com.br/> (acesso 10.11.2015).

University of Hertfordshire - UH, 2016. The University of Hertfordshire Agricultural Substances Database Background and Support Information. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> (acesso 10.01.2016).

Urban, D.J., Cook, N. J., 1986. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure Ecological risk assessment. USEPA Publication EPA/540/09-88-035. 96p.

Valcárcel, Y., Alonso, S.G., Gil, J.L.R., Catalá, M., 2011. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*. 84, 1336-1348.

Velisek, J., Stara, A., Kolarova, J., Svobodova, Z., 2011. Biochemical, physiological and morfological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. *Pestic. Biochem. Phys.* 100, 305-313.

Villarroel, M.J., Sancho, E., Ferrendo, M.D., Andreu, E., 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicides propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 53, 857-864.

Vryzas, Z., Papadakis, E.N., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2012. Leaching of Br⁻, metolachlor, alachlor, atrazine, deethylatrazine and deisopropylatrazine in clayey vadoze zone: A field scale experiment in north-east Greece. *Water Res.* 46, 979-989.

Whyatt, R.M., Rauh, V., Barr, D. B., Camann, D.E., Andrews, H.F., Garfinkel, R., Hoepner, L.A., Diaz, D., Dietrich, J., Reyes, A., Tang, D., Kinney, P.L., Perera, F.P., 2004. Prenatal Insecticide Exposures and Birth Weight and Length among an Urban Minority Cohort. *Environ. Health Persp.* 112, 1125-1132.

Wu, S.M., Lin, H.C., Yang, W.L., 2008. The effects of maternal Cd on the metallothionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. *Aquat. Toxicol.* 87, 296–302.

Yeh, C.H., Liao, Y.F., Chang, C.Y., Tsai, J.N., Wang, Y.H., Cheng, C.C., Wen, C.C., Chen, Y.H., 2012. Caffeine treatment disturbs the angiogenesis of zebrafish embryos. *Drug Chem. Toxicol.* 35, 361-365.

Zagato, P.A., Bertoletti, E., 2008. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações, in: Zagato, P.A., Bertoletti, E. (Eds.). RiMa, São Carlos, 486p.

Zucker, E., 1985. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. USEPA Publication 540/9-85-006, Washington, 17p.