

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

Alana Cristina Dorneles Wandscheer

**MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS EM LAVOURA DE ARROZ
IRRIGADO SOB EFEITO DE FUNGICIDAS E INSETICIDAS**

**Santa Maria, RS
2016**

Alana Cristina Dorneles Wandscheer

**MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS EM LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO
SOB EFEITO DE FUNGICIDAS E INSETICIDAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Agronomia, da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para
obtenção do título de **Doutor em Agronomia**

Orientador: Prof^o Dr. Enio Marchesan

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dorneles Wandscheer, Alana Cristina
MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS EM LAVOURA DE ARROZ
IRRIGADO SOB EFEITO DE FUNGICIDAS E INSETICIDAS / Alana
Cristina Dorneles Wandscheer.-2016.
98 p.; 30cm

Orientador: Enio Marchesan
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2016

1. Agrotóxicos 2. macroinvertebrados bentônicos 3.
genotoxicidade 4. toxicidade aguda I. Marchesan, Enio
II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Alana Cristina Dorneles Wandscheer. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

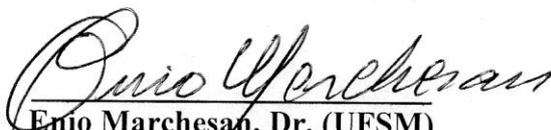
E-mail: alanacdw@hotmail.com

Alana Cristina Dorneles Wandscheer

**MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS EM LAVOURA DE ARROZ
IRRIGADO SOB EFEITO DE FUNGICIDAS E INSETICIDAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Agronomia, da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para
obtenção do título de **Doutor em Agronomia**

Aprovado em 29 de fevereiro de 2016:



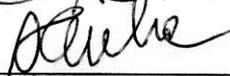
Emio Marchesan, Dr. (UFSM)
Presidente/Orientador



Sérgio Luiz de Oliveira Machado, Dr. (UFSM)
Co-orientador



Sandro Santos, Dr. (UFSM)



André Andres, Dr. (Embrapa Clima Temperado)



Lilian Terezinha Winckler Sosinski, Dra. (Embrapa Clima Temperado)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada é possível.

À minha mãe Eva, meu pai Kurt, meu irmão Diego, minha avó Natalia, os quais estiveram sempre presentes e compartilharam deste momento comigo.

Ao meu noivo Mauri, quem sempre me deu forças para seguir em direção aos meus sonhos, quem nunca me deixou desistir, mesmo quando os obstáculos pareciam ser maiores do que eu poderia suportar.

Ao meu orientador, professor Enio Marchesan, o qual abriu as portas para mim, recebendo-me em seu grupo de pesquisa, lugar onde pude aprender ensinamentos e valores que certamente levarei para toda a vida, onde pude crescer pessoal e profissionalmente.

Aos professores Sérgio Luiz de Oliveira Machado, Sandro Santos, Solange Bosio Tedesco, Renato Zanella, Carla Bender Kotzian, Sidinei José Lopes, Alberto Cargnelutti Filho, obrigada pelo auxílio na elaboração do projeto de doutorado, nos experimentos laboratoriais e de campo.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade na realização do curso de Doutorado, pela infra-estrutura disponibilizada para a realização da pesquisa.

À CAPES, pela bolsa de doutorado no país e no exterior, e ao CNPq, pelo auxílio financeiro para realização da pesquisa, através do Edital Universal – MCTI/CNPq n. 14/2012.

À Texas Tech University e ao Department of Environmental Toxicology pela disponibilidade dos laboratórios para a realização de parte da pesquisa.

Ao Dr. Jonathan D. Maul, da Texas Tech University, pela acolhida em seu grupo de pesquisa, pela amizade, pela disponibilidade em responder às minhas dúvidas e pela paciência com a Língua Inglesa. Um exemplo de profissional, ao qual tive a honra de conviver por alguns meses.

Aos colegas do Maul Lab, Kara Minton e Morgan Willming, pela paciência e auxílio nos experimentos. Obrigada pela amizade, por me permitirem vivenciar a cultura americana e contribuírem para o aperfeiçoamento da Língua Inglesa.

A todos os colegas do GPai, que contribuíram de forma significativa para a realização desta tese. Obrigada a todos pela amizade nestes quatro anos de curso, pelas aprendizagens sobre agronomia, pelas risadas, pela troca de experiências. Foi maravilhoso poder fazer parte desse grupo de pesquisa, referência na área da agronomia. Agradeço especialmente aos bolsistas que auxiliaram no projeto, Camille Flores Soares, Marília Ferreira da Silva e Bruno

Behenck Aramburu. Também aos colegas que auxiliaram nas coletas de campo e lavagem das amostras, Guilherme Pilar Londero, Anelise Lencina da Silva, Gabriel Donato, Luan Pierre Pott, Ricardo De David, Vinicius Severo Trivisiol e Isac Aires de Castro.

Obrigada aos colegas de pós-graduação do GPai, especialmente Gustavo Mack Teló, Dâmaris S. S. Hansel, Gerson M. S. Sartori, Guilherme Pilar Londero, Robson Giacomeli, Lilian Oliveira, Guilherme Cassol, Maurício Limberger de Oliveira e Lucas Lopes Coelho, pelo companheirismo, pela amizade, pela convivência, pelos aprendizados.

Ao Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP), ao Laboratório de Citogenética Vegetal e ao Laboratório de Carcinologia da UFSM, pela possibilidade de trabalharmos em conjunto, possibilitando melhor qualificação dos trabalhos. Agradeço especialmente aos colegas e amigos Joele S. Baumart, Mateus Marques Pires e Viviane Frescura, pelo auxílio nos experimentos e por esclarecem dúvidas sempre que necessário.

A todos os amigos, de Santa Maria e de Seberi, os quais compartilharam deste momento comigo, meu muito obrigado pela amizade e pelo apoio.

A todos que não foram lembrados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS EM LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO SOB EFEITO DE FUNGICIDAS E INSETICIDAS

AUTORA: Alana Cristina Dorneles Wandscheer

ORIENTADOR: Enio Marchesan

A lavoura de arroz irrigado apresenta importância econômica e social para o estado do Rio Grande do Sul. É considerado um ambiente rico em diversidade biológica, pois abriga uma gama de comunidades de animais, especialmente invertebrados. Entretanto, a utilização intensiva de agrotóxicos tem levado a preocupações quanto ao impacto sobre os organismos aquáticos não alvos. Objetivou-se na presente pesquisa avaliar os efeitos de fungicidas e inseticidas utilizados na cultura do arroz irrigado sobre a comunidade de macroinvertebrados aquáticos bentônicos. Para isso, foram realizados experimentos de campo e laboratoriais. Dois experimentos de campo (safras 2012/13 e 2013/14) foram realizados em área didático experimental de várzea, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, em parcelas experimentais de 10m² cultivadas com arroz irrigado e parcelas controle com e sem plantas de arroz, com lâmina de água de 10 cm de altura. Os tratamentos: trifloxistrobina + tebuconazol (50 + 100 g i.a.ha⁻¹), triciclazol (225 g i.a.ha⁻¹), lambda-cialotrina + tiametoxam (15,9 + 21,1 g i.a.ha⁻¹) e diflubenzuron (19,2 g i.a.ha⁻¹) foram aplicados em dose única sobre as plantas de arroz em estágio R3. Amostras de solo foram coletadas para avaliação da riqueza e densidade da fauna de macroinvertebrados bentônicos. Parâmetros físico-químicos da água, tais como temperatura, pH e oxigênio dissolvido e a persistência dos agrotóxicos na água e no solo foram avaliados durante os experimentos. A suficiência amostral para estudos com a comunidade de macroinvertebrados bentônicos em áreas de cultivo de arroz irrigado foi definida. Dois ensaios laboratoriais foram realizados a fim de complementar os estudos de campo. O primeiro experimento objetivou verificar os efeitos citotóxicos e genotóxicos de triciclazol, através do bioindicador *Allium cepa* e, o segundo experimento, objetivou verificar a toxicidade aguda dos princípios ativos lambda-cialotrina e tiametoxam, isolados e em misturas, sobre organismos da espécie *Chironomus dilutus*. Os resultados mostraram que o estabelecimento da comunidade de macroinvertebrados bentônicos é favorecido quando em ambiente natural, livre de agrotóxicos e sem plantas de arroz. Entretanto, a aplicação de apenas uma dose dos fungicidas trifloxistrobina + tebuconazol e triciclazol e dos inseticidas lambda-cialotrina + tiametoxam e diflubenzuron não ocasionou efeitos significativos sobre a riqueza e densidade de macroinvertebrados. Tebuconazol, triciclazol e tiametoxam apresentaram elevada persistência na água de irrigação da lavoura de arroz irrigado. Triciclazol causou também aumento da atividade genotóxica na água de irrigação da lavoura de arroz, através do aparecimento de alterações cromossômicas, sem, contudo, causar efeitos significativos sobre o índice mitótico. As doses testadas do piretróide lambda-cialotrina e do neonicotinóide tiametoxam, isolados ou em misturas, não causaram alterações significativas sobre organismos da espécie *Chironomus dilutus*, em estudos laboratoriais.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Impacto ambiental. Agrotóxicos. Invertebrados aquáticos. Genotoxicidade. Toxicidade aguda.

ABSTRACT

BENTHIC MACROINVERTEBRATES IN IRRIGATED RICE FIELD UNDER EFFECT OF FUNGICIDES AND INSECTICIDES

AUTHOR: ALANA CRISTINA DORNELES WANDSCHEER
ADVISOR: ENIO MARCHESAN

The irrigated rice crop has economic and social importance for the state of Rio Grande do Sul. It is considered an environment rich in biological diversity, it is home for a range of animal communities, especially invertebrates. However, the intensive use of pesticides has led to concerns about the impact on non-target aquatic organisms. The objective in this study was to evaluate the effects of fungicides and insecticides currently used in irrigated rice crop on the community of benthic macroinvertebrate. For this, field and laboratory experiments were conducted. Two field experiments (seasons 2012/13 and 2013/14), in an experimental lowland area, in the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil were carried out in 10m² plots cultivated with rice plants and control plots with and without rice plants, with a water depth of 10 cm. The treatments: trifloxystrobin + tebuconazole (50 + 100 g a.i. ha⁻¹), tricyclazole (225 g a.i ha⁻¹), lambda-cyhalothrin + Thiamethoxam (15.9 + 21.1 g a.i ha⁻¹) and diflubenzuron (19.2 g a.i ha⁻¹) were applied as a single dose on rice plants at stage R3. Soil samples were collected to evaluate the richness and density of benthic macroinvertebrate fauna. Physical and chemical water parameters such as temperature, pH and dissolved oxygen, and the persistence of pesticides in water and soil were evaluated during the experiments. The sample sufficiency for studies of the benthic macroinvertebrate community in rice crop areas was set. Two laboratory tests were carried out to complement the field studies. The first experiment aimed to verify the cytotoxic and genotoxic effects of tricyclazole through the bioindicator *Allium cepa* and the second experiment, aimed to verify the acute toxicity of the lambda-cyhalothrin and thiamethoxam active ingredients, alone and in combinations, on the species *Chironomus dilutus* organisms. The results showed that the establishment of the benthic macroinvertebrate community is favored in the natural environment without pesticides and rice plants. However, the application of a single dose of trifloxystrobin + tebuconazole fungicides and tricyclazole and lambda-cyhalothrin insecticide thiamethoxam + diflubenzuron causes no significant effects on the macroinvertebrate richness and density. Tebuconazole, tricyclazole and thiamethoxam had high persistence in irrigation water of the rice crop. Also, tricyclazole increased the genotoxic activity in the irrigation water of the rice crop, through the emergence of chromosomal alterations, without, however, causing significant effects on the mitotic index. The tested doses of lambda-cyhalothrin pyrethroid and thiamethoxam neonicotinoid, alone or in combinations, did not cause significant changes on organisms of the species *Chironomus dilutus* in laboratory studies.

Keywords: *Oryza sativa*. Environmental impact. Pesticides. Aquatic invertebrates. Genotoxicity. Acute toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

Figura 1 - Curva cumulativa para os táxons encontrados na lavoura de arroz na safra 2012/13. Os pontos expressam a curva cumulativa média, gerada pela adição aleatória das amostras. As barras indicam o desvio padrão. Santa Maria, 2014..... 25

ARTIGO 3

Figure 1 – Chromosomal abnormalities observed in *Allium cepa* cells after application of tricyclazole. (A): anaphasic bridges (B): laggard chromosomal (C): micronuclei cell (D): binucleate cell. Santa Maria, 2014..... 64

ARTIGO 4

Figure 1 - *Chironomus dilutus* LC50 ($\mu\text{g/L}$) after 10-d exposure to six concentrations of thiamethoxam. Error bars represent $\pm\text{SE}$ of the mean..... 82

Figure 2 - *Chironomus dilutus* survival (A), body length (B), head capsule width (C) and dry mass (D) after 10-d exposure to three concentrations of thiamethoxam and three concentrations of lambda-cyhalothrin and their combination. Error bars represent $\pm\text{SE}$ of the mean..... 83

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Características químicas e toxicológicas e dose de aplicação dos agrotóxicos na lavoura arrozeira. Santa Maria, RS, 2015..... | 15 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

ARTIGO 2

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos da água..... | 45 |
| Tabela 2 – Concentração dos agrotóxicos na água e no solo..... | 46 |
| Tabela 3 - Densidade (organismos/m ²) de macroinvertebrados bentônicos em cada tratamento, nos dois anos de estudo..... | 47 |
| Tabela 4 - Análise de variância de dois critérios para a densidade de macroinvertebrados bentônicos nas duas safras agrícolas..... | 48 |
| Tabela 5 - Matriz de correlações para a densidade (org/m ²) de macroinvertebrados bentônicos, parâmetros físico-químicos e concentração dos agrotóxicos na água, na safra 2012/13..... | 49 |
| Tabela 6 - Matriz de correlações para a densidade (org/m ²) de macroinvertebrados bentônicos, parâmetros físico-químicos e concentração dos agrotóxicos na água, na safra 2013/14..... | 50 |

ARTIGO 3

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1 – Number of <i>Allium cepa</i> cells at the interphase and mitosis stages. Santa Maria, 2014 | 62 |
| Table 2 – Number of <i>Allium cepa</i> cells in cell division and chromosomal abnormalities. Santa Maria, 2014..... | 63 |

ARTIGO 4

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1 - Treatments used to test the acute toxicity of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin for <i>C. dilutus</i> | 80 |
| Table 2 - Conductivity, pH e dissolved oxygen (DO) from the water of the experimental units at day 0 (first day of the experiment) and day 10 (the last day of the experiment)..... | 81 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 12 |
| 1.1.1 | A lavoura de arroz irrigado | 12 |
| 1.1.2 | Fungicidas e inseticidas e seus efeitos sobre organismos não alvos | 13 |
| 1.1.2.1 | <i>Trifloxistrobina</i> | 14 |
| 1.1.2.2 | <i>Tebuconazol</i> | 16 |
| 1.1.2.3 | <i>Triciclazol</i> | 17 |
| 1.1.2.4 | <i>Lambda-cialotrina</i> | 18 |
| 1.1.2.5 | <i>Tiametoxam</i> | 19 |
| 1.1.2.6 | <i>Diflubenzuron</i> | 20 |
| 2 | DESENVOLVIMENTO | 22 |
| 2.1 | ARTIGO 1 | 22 |
| 2.2 | ARTIGO 2 | 29 |
| 2.3 | ARTIGO 3 | 51 |
| 2.4 | ARTIGO 4 | 65 |
| 3 | DISCUSSÃO | 84 |
| 4 | CONCLUSÕES | 88 |
| | REFERÊNCIAS | 89 |
| | APÊNDICE A – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 98 |

1 INTRODUÇÃO

A cultura do arroz irrigado apresenta importância econômica e social para o estado do Rio Grande do Sul, sendo o estado brasileiro que ocupa a primeira posição na produção de grãos do país. Aliado à elevada produtividade de grãos, o consumo e demanda por agrotóxicos vem aumentando continuamente, o que leva a preocupações ambientais e riscos às espécies que coabitam os ambientes de terras baixas, onde se cultiva a maior parte do arroz irrigado no Brasil, visto que estes agroecossistemas abrigam uma ampla diversidade faunística.

Já é conhecido que agrotóxicos podem causar efeitos negativos sobre organismos não alvos. Estudos evidenciaram que aplicações de defensivos agrícolas em arroz irrigado causaram impacto nas comunidades de artrópodes, peixes, fitoplâncton, zooplâncton e macroinvertebrados bentônicos. No entanto, a maioria das pesquisas foca nos herbicidas utilizados na cultura, visto que estes produtos são aplicados diretamente no solo, antes da inundação da lavoura. Porém, pode haver ocorrência de pragas e doenças em fase muito próxima ao momento da colheita, o que requer aplicações de fungicidas e inseticidas para seu controle. A aplicação de fungicidas e inseticidas nesta fase do ciclo do arroz pode acarretar em contaminação do ambiente, especialmente se houver drenagem da água contendo os agrotóxicos para rios e lagos próximos, podendo também causar impacto negativo aos organismos não alvos que habitam a lavoura neste período. Além disso, estes compostos podem apresentar potencial genotóxico e causar alterações cromossômicas e na divisão celular, com riscos às espécies aquáticas.

Dentre os vários organismos bioindicadores de qualidade ambiental, os macroinvertebrados bentônicos se destacam pelo pequeno ciclo de vida junto aos sedimentos que podem acumular resíduos de agrotóxicos. Além disso, respondem rapidamente às mudanças do meio por serem sensíveis à poluição ambiental. Associar as características desse grupo à qualidade do meio é eficaz para se verificar o quanto o manejo da cultura do arroz irrigado pode estar influenciando a estrutura dessa comunidade.

O conhecimento dos possíveis efeitos de agrotóxicos sobre organismos aquáticos não alvos é algo promissor e necessário, visto que a tendência na utilização destes produtos é cada vez maior. Neste contexto, o objetivo da presente tese foi avaliar o impacto da utilização de fungicidas e inseticidas da lavoura de arroz irrigado para a fauna de macroinvertebrados bentônicos, os quais são organismos aquáticos não alvos habitantes desses agroecossistemas. Para isso, no artigo 1 determinou-se a suficiência amostral para estudos de impacto ambiental

com a comunidade de macroinvertebrados aquáticos bentônicos em lavouras de arroz irrigado. No artigo 2, o objetivo foi verificar modificações na riqueza e densidade da comunidade de macroinvertebrados aquáticos bentônicos presentes na lavoura de arroz irrigado após aplicações de fungicidas e inseticidas, além da persistência dos princípios ativos na água e no solo e sua relação com os organismos. No artigo 3, estudou-se a genotoxicidade da água de irrigação da lavoura de arroz irrigado após aplicação do fungicida tebuconazol, através do teste do *Allium cepa* e, no artigo 4, um teste de toxicidade aguda de sedimento foi realizado com organismos da espécie *Chironomus dilutus*, objetivando verificar a toxicidade dos princípios ativos tiametoxam e lambda-cialotrina, isolados e em misturas.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 A lavoura de arroz irrigado

O arroz é um dos cereais mais importantes do mundo, sendo a base alimentar de mais de 3 bilhões de pessoas. O estado do Rio Grande do Sul destaca-se na produção nacional de grãos, sendo responsável por mais de 61% do total produzido no Brasil (SOSBAI, 2014). Entretanto, a expansão do cultivo do arroz tem sido associada com o declínio das áreas úmidas naturais no mundo (STENERT et al., 2009), visto que grande parte destas áreas foram destinadas à orizicultura (COLPO et al., 2009).

As áreas de cultivo de arroz são consideradas agroecossistemas úmidos, manejados temporariamente pelo homem (LUPI et al. 2013), sendo um ambiente com elevada diversidade biológica de invertebrados aquáticos e terrestres em comparação a outras áreas agrícolas (STENERT et al. 2012). Os organismos que vivem nesse sistema têm de ser muito bem adaptados às rápidas mudanças das condições ambientais, incluindo-se a diminuição da água durante a entressafra, as várias perturbações ocasionadas pelo manejo da cultura e a entrada de agrotóxicos no ambiente (BAMBARADENIYA et al., 2004).

Um dos trabalhos mais bem documentados a respeito da biodiversidade em lavouras de arroz foi realizado por Bambaradeniya et al. (2004) em Sri Lanca, na Ásia, durante cinco safras da cultura, onde observaram a presença de 494 espécies de invertebrados e 103 espécies de vertebrados, sendo que 15 espécies de invertebrados e uma espécie de planta daninha foram novos registros para Sri Lanca. Os autores observaram também que os artrópodes representaram o grupo dominante, com 405 espécies.

Sendo a lavoura de arroz irrigado um habitat para diversas espécies de animais, a utilização intensiva de agrotóxicos, tais como herbicidas, fungicidas, inseticidas podem ocasionar sérios riscos à sobrevivência dos organismos que habitam esse ambiente. Nesse contexto, as respostas dos insetos aquáticos e outros grupos de invertebrados em decorrência do manejo da lavoura de arroz e aplicações de agrotóxicos têm sido estudados em muitos países, como Portugal (LEITÃO et al., 2007), Brasil (MOLOZZI et al., 2007), Estados Unidos (MIZE et al., 2008) e França (SUHLING et al., 2000).

Embora invertebrados aquáticos sejam as espécies mais predominantes nos ambientes de várzeas, anfíbios, peixes, mamíferos, além de plantas aquáticas, fazem parte do ecossistema. O cultivo consorciado de arroz irrigado e a criação de peixes é uma alternativa

para a diversificação da produção visando maior rentabilidade ao produtor e a sustentabilidade em áreas de várzea (GOLOMBIESKI et al., 2007).

Os invertebrados aquáticos que habitam os substratos de fundo nos habitats de água doce durante parte do seu ciclo de vida podem ser chamados de macroinvertebrados bentônicos (ROSENBERG & RESH, 1993). Os macroinvertebrados bentônicos são organismos que podem ser retidos em peneira de malha ≥ 200 a 500 μm normalmente representados por espécies de Insecta, Annelida, Nemertinea, Crustacea, Mollusca e alguns Turbellaria e Bryozoa (KUHLMANN et al., 2012). Estes organismos são habitantes naturais em lavouras de arroz irrigado e bastante utilizados em avaliações de impacto ambiental, visto apresentarem inúmeras características vantajosas como abundância populacional, fácil identificação e um baixo custo, ampla distribuição nos ecossistemas de água doce e sensibilidade aos fatores de perturbação (GAMBOA et al., 2008). Estudo realizado por Feld & Hering (2007) demonstrou a importância de medidas funcionais de macroinvertebrados bentônicos na avaliação de impacto ambiental, tais como guildas funcionais, diversidade e abundância de organismos e medidas de sensibilidade e tolerância.

Bambaradeniya & Amerasinghe (2003) ressaltam que os mosquitos são os insetos aquáticos mais estudados em arrozais. Já para a fauna de moluscos, há relativamente poucos estudos, embora representam importante componente da comunidade aquática de lavouras de arroz. A abundância de indivíduos da família Chironomidae é considerado um índice biótico que estima a tolerância de bentos aos contaminantes, o qual pode ser utilizado para avaliar a contaminação por matéria orgânica (GAMBOA et al., 2008).

As práticas de manejo na cultura do arroz irrigado ocasionam alterações na comunidade de invertebrados aquáticos. Rizo-Patrón et al. (2013) observaram que a abundância de invertebrados resistentes à poluição foi maior nas lavouras de cultivo convencional em comparação às lavouras de cultivo orgânico, concluindo que tais organismos respondem ao tipo de manejo e aos agrotóxicos que são aplicados na lavoura.

Considerando-se que as lavouras de arroz irrigado estão em sua maioria localizadas próximas às margens de córregos, riachos, rios e outros mananciais de água, estes se tornam passíveis de ser contaminados por agrotóxicos aplicados na cultura. Nos ambientes de água doce, o fitoplâncton, zooplâncton, macroinvertebrados bentônicos e peixes são os organismos mais comumente testados para se avaliar os efeitos tóxicos dos agrotóxicos (TREMOLADA et al. 2004).

1.1.2 Fungicidas e inseticidas e seus efeitos sobre organismos não alvos

1.1.2.1 Trifloxistrobina

Trifloxistrobina (Tabela 1) é um fungicida mesostêmico que pode ser utilizado como princípio ativo sozinho ou em combinação com outros princípios ativos. Na cultura do arroz irrigado, a formulação comercial trifloxistrobina + tebuconazol é utilizada no controle da mancha parda (*Bipolaris oryzae*), mancha estreita (*Cercospora janseana* = *C. oryzae*) e a escaldadura ou queima da folha (*Gerlachia oryzae* = *Rhynchosporium oryzae*) (SOSBAI, 2012).

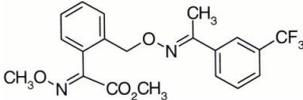
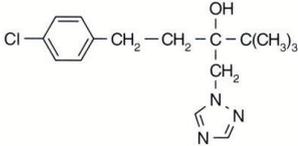
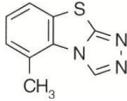
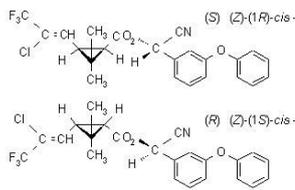
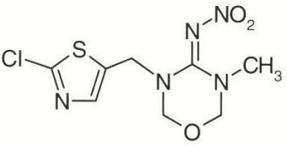
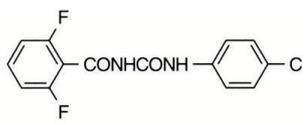
Em lavouras de arroz, residuais de trifloxistrobina estão altamente correlacionados ao risco ecológico, no entanto, ainda não está claro como ocorrem tais processos. Trifloxistrobina apresentou meia-vida entre 0,7 e 7,5 dias em arrozais. Entretanto, seu principal metabólito apresentou alta persistência na água, indicando que em longo prazo a aplicação frequente do fungicida pode representar risco potencial para organismos aquáticos que habitam o agroecossistema do arroz (CAO et al., 2015).

Estudos laboratoriais observaram efeitos tóxicos de trifloxistrobina sobre anfíbios (JUNGES et al., 2012), crustáceos como *Daphnia magna* (OCHOA-ACUNA et al., 2009) e *Hyaella azteca* (MORRISON et al., 2013), e sobre peixes (USEPA, 2013). Os peixes podem estar presentes em lavouras de arroz através da sua entrada pela água de irrigação ou quando adicionados visando a rizipiscicultura (LAWLER, 2001). O desenvolvimento embrionário e larval do peixe *Oryzias latipes* foi alterado após exposição à trifloxistrobina (ZHU et al. 2015a). Liu et al. (2013) observaram que estrubilurinas, dentre elas trifloxistrobina, foi tóxica para *Ctenopharyngodon idella*, umas das espécies de peixe mais importantes na aquacultura da China. Trifloxistrobina também apresentou inúmeros efeitos tóxicos em embriões de *Gobiocypris rarus*, através do aumento de malformações, alterações na frequência cardíaca e atividades enzimáticas, além de danos no DNA, sugerindo que trifloxistrobina é altamente tóxica para embriões de peixes (ZHU et al. 2015b).

Em quironomídeos, testes de toxicidade crônica de sedimento mostraram uma CE50 (concentração efetiva para 50% dos organismos) de 0,45 mg L⁻¹ (28 d, *Chironomus riparius*) e NOEC (maior concentração onde não se observam efeitos) de 0,2 mg L⁻¹ (28 d, *Chironomus riparius*). Entretanto, para o metabólito CGA 321113, os efeitos foram menos significativos, sendo a CE50 de 49,2 mg L⁻¹ (28 d, *Chironomus riparius*) e NOEC de 25 mg L⁻¹ (28 d, *Chironomus riparius*) (EUROPEAN COMMISSION, 2003). Estudos feitos com o anfípodo *Hyaella azteca* demonstraram que a toxicidade de trifloxistrobina pode variar em função das

condições do ambiente, isto é, a presença de sedimento pode ocasionar diminuição na toxicidade de determinadas formulações fungicidas (MORRISON et al., 2013).

Tabela 1 - Características químicas e toxicológicas e dose de aplicação dos agrotóxicos.

| Princípio ativo | Grupo químico | Fórmula estrutural | Kow | Classe toxicológica | Dose (g i.a.ha ⁻¹) |
|-------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------------------|--------------------------------|
| Trifloxistrobina | Estrobilurina |  | 4,5 | II | 50 |
| Tebuconazol | Triazol |  | 3,7 | IV | 100 |
| Triciclazol | Benzotiazol |  | 1,42 | II | 225 |
| Lambda-cialotrina | Piretróide |  | 6,9 | III | 15,9 |
| Tiametoxam | Neonicotinóide |  | -0,13 | III | 21,15 |
| Diflubenzuron | Benzoiluréia |  | 3,89 | IV | 19,20 |

Fonte: ANVISA (2014), SOSBAI (2012). II – Altamente tóxicos, III – Medianamente tóxicos, IV – Pouco tóxicos.

1.1.2.2 Tebuconazol

A literatura apresenta diversos estudos laboratoriais sobre os efeitos de tebuconazol em parâmetros como mortalidade, crescimento, comportamento e fisiologia de organismos aquáticos não alvos. Grande parte desses estudos foram realizados com crustáceos tais como *Gammarus pulex* (ADAM et al., 2009), *Daphnia magna* e *Americamysis bahia* (USEPA, 2013), peixes tais como *Rhamdia quelen* (KREUTZ et al., 2008), *Danio rerio* (ANDREU-SANCHEZ et al., 2012), *Cyprinodon variegatus* e *Oncorhynchus mykiss* (USEPA, 2013), e alguns moluscos tais como *Crassostrea virginica* (USEPA, 2013).

A resposta ao estresse em alevinos de jundiá da espécie *Rhamdia quelen* foi avaliada após exposição aguda a agrotóxicos, dentre eles o fungicida tebuconazol. Foi observado que a presença do estímulo estressante influenciou mais significativamente nos parâmetros de desempenho do peixe do que a própria exposição ao fungicida (KOAKOSKI et al., 2014). Outro estudo recente avaliou os efeitos tóxicos de tebuconazol sobre diversos parâmetros de indivíduos da espécie *Daphnia magna*. Os resultados mostraram que o número de neonatos por fêmea foi o parâmetro mais sensível à exposição ao tebuconazol e um período de recuperação de sete dias em um meio livre de toxicidade não foi suficiente para restabelecer os parâmetros normais de reprodução em dafnídeos pré-expostos ao fungicida (SANCHO et al., 2016). Embora efeitos tóxicos de tebuconazol sobre comunidades microbianas presentes em sedimentos não tenham sido observados, efeitos tóxicos em nível trófico maior foi observado quando anfípodos da espécie *Gammarus pulex* foram alimentados com folhas expostas ao fungicida tebuconazol, o que causou redução na taxa de alimentação dos organismos (DIMITROV et al., 2014).

A enantioseletividade é um fenômeno que pode contribuir para a toxicidade dos agrotóxicos no ambiente natural e tem sido estudado recentemente. A enantioseletividade de tebuconazol foi avaliada sobre três espécies aquáticas, *Scenedesmus obliquus*, *Daphnia magna* e *Danio rerio*, sendo que R - (-) - tebuconazol foi cerca de 1,4 - 5,9 vezes mais tóxico do que o S - (+) - tebuconazol. A enantioseletividade de tebuconazol mostrou uma relação significativa com as propriedades do solo. Esta propriedade pode ser um fenômeno comum na biodegradação de fungicidas triazóis quirais e na toxicidade aquática e, por isso, deve ser considerada quando se avaliam os riscos ecotoxicológicos destes compostos no meio ambiente (LI et al., 2015). Atualmente, métodos têm sido estudados para determinação da enantioseletividade de tebuconazol (LIU et al., 2015). Estudos indicam que nenhuma degradação enantioseletiva significativa foi observada para tebuconazol em condições

esterilizadas (ZHANG et al., 2015), mostrando a importância da matéria orgânica na degradação enantiosseletiva do fungicida.

Os agrotóxicos geram produtos de transformação quando são liberados no ambiente, os quais podem ser altamente tóxicos. No entanto, é difícil prever a ocorrência desses produtos e o potencial risco ambiental. Produtos de transformação do fungicida tebuconazol foram identificados no solo durante um estudo de campo, o qual detectou cerca de 22 produtos conhecidos e 12 produtos de transformação ainda desconhecidos (STORCK et al., 2015), o que denota a importância de mais estudos com esse fungicida, visando a toxicidade de seus compostos para organismos aquáticos não alvos após degradação no ambiente.

Além dos efeitos tóxicos sobre as funções fisiológicas dos organismos, efeitos sobre o DNA são importantes quando se considera o risco ambiental para organismos não alvos. O potencial genotóxico do princípio ativo tebuconazol foi avaliado em embriões de caracóis da espécie *Cantareus aspersus*, onde foram observadas alterações nos indivíduos em doses a partir de 0,05 mg/L de tebuconazol (BAURAND et al., 2015).

1.1.2.3 Triciclazol

O triciclazol é um fungicida sistêmico do grupo químico benzotiazol utilizado na cultura do arroz para controle de brusone (*Pyricularia grisea*) (SOSBAI, 2012). Estudos indicam que triciclazol apresenta alto risco de contaminação ambiental, não sendo prontamente hidrolisável no ambiente e com alta capacidade de adsorção ao solo (PADOVANI et al., 2006).

Embora triciclazol seja um dos fungicidas mais utilizados na lavoura de arroz, ainda há na literatura pouca informação disponível sobre os efeitos tóxicos deste sobre organismos aquáticos não alvos, sendo que as informações disponíveis referem-se a testes de toxicidade aguda com bioindicadores (ainda poucas espécies) em condições laboratoriais. A mortalidade do anfíbio *Rana limnocharis* após exposição ao triciclazol foi observada por Pan & Liang (1993), os quais encontraram uma CL50 de 19425 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o peixe *Lepomis macrochirus*, a CL50 foi de 2460 (1690-3880) $\mu\text{g L}^{-1}$ e para *Oncorhynchus mykiss* a CL50 foi de 1810 (1500-2200) $\mu\text{g L}^{-1}$ (USEPA, 2013). A intoxicação de embriões do molusco *Crassostrea virginica* também foi observada em condições laboratoriais, sendo que a CE50 encontrada foi de 32000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (USEPA, 2013).

Triciclazol causou aumento nos níveis de triglicerídeos, colesterol, glucose e lactato em peixes da espécie *Danio rerio*, além de desordens enzimáticas que foram observadas após a

recuperação dos organismos ao final do experimento (SANCHO et al., 2009). Um dos poucos trabalhos encontrados sobre os efeitos de triciclazol em macroinvertebrados bentônicos foi desenvolvido por Rossaro & Cortesi (2013), os quais não observaram efeitos negativos significativos do fungicida nos testes em campo. Nos testes de toxicidade aguda em condições laboratoriais, triciclazol apresentou também baixa toxicidade sobre os invertebrados, com CL50 (48h) de 26 mg L⁻¹.

1.1.2.4 Lambda-cialotrina

Lambda-cialotrina é um inseticida piretróide halogenado que compreende uma mistura de dois estereoisômeros, amplamente empregado no controle de pragas (COLOMBO et al., 2013). Inseticidas piretróides tais como lambda-cialotrina, são compostos hidrofóbicos que nos ambientes aquáticos podem se ligar à matéria orgânica, como detritos, folhas e fitoplâncton, que são importantes na estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos. No entanto, o grau de partição dos piretróides entre diferentes frações de carbono orgânico depende da biodisponibilidade, o que pode influenciar a toxicidade para invertebrados aquáticos (MAUL et al., 2008).

Na natureza, há uma gama de contaminantes que interagem entre si, ocasionando efeitos sinérgicos ou antagônicos sobre as espécies. Lambda-cialotrina, cádmio e o neonicotinóide imidacloprid foram testados em combinações e seus efeitos tóxicos sobre minhocas da espécie *Eisenia fetida*. A combinação de lambda-cialotrina e cádmio resultou em efeitos sinérgicos leves sobre os organismos, enquanto que misturas binárias com imidacloprid resultaram em efeitos antagônicos, os quais foram mais significativos em misturas ternárias com este inseticida (WANG et al., 2015).

Em ensaios de laboratório, Schroer et al. (2004) observaram que *Chaoborus obscuripes* (Diptera: Chaoboridae) foi a espécie mais sensível a lambda-cialotrina (CE50 48 e 96h = 2,8 ng L⁻¹), seguido por outras larvas de insetos da ordem Hemiptera e Ephemeroptera e macrocrustáceos, os quais foram relativamente sensíveis, apresentando valores de CE50 (48 e 96h) entre 10 e 100 ng L⁻¹. Os grupos menos sensíveis foram os microcrustáceos (Cladocera, Copepoda) e larvas de insetos da ordem Odonata e Chironomidae, os quais apresentaram valores de CE50 (48h) maiores do que 100 ng L⁻¹.

Na literatura, podem-se encontrar diversos estudos recentes sobre efeitos tóxicos de lambda-cialotrina em peixes. Foi observado que a qualidade do esperma de indivíduos da espécie *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) foi significativamente reduzida pela exposição

a lambda cialotrina (KUTLUYER et al., 2015). No peixe *Danio rerio*, lambda-cialotrina causou perturbação no sistema endócrino, sendo que os hormônios T3 e T4 foram significativamente alterados após exposição ao inseticida (TU et al, 2016). Em outro estudo realizado com embriões de peixe-zebra foi observado que piretróides sintéticos possuem elevada capacidade de bioconcentração, sugerindo que piretróides possuem um risco altamente cumulativo para os peixes (TU et al., 2014).

Trabalhos recentes têm demonstrado que a enantioseletividade pode ser mais um fator a ser considerado na toxicidade de compostos no ambiente. A biodisponibilidade e a enantioseletividade de lambda cialotrina e bifentrin foi verificada em minhocas da espécie *Eisenia fetida*. Os resultados mostraram que lambda-cialotrina foi mais facilmente adsorvida no solo em relação à bifentrin e a bioacumulação de ambos os produtos foi enantioseletiva (CHANG et al., 2016). Recentemente, Wielogórska et al. (2015) verificaram que metabólitos de piretróides são preocupantes em relação a sua atividade estrogênica, a qual é relativamente superior aos seus compostos de origem.

1.1.2.5 Tiametoxam

Os neonicotinóides são inseticidas sistêmicos altamente potentes e seletivos (VEHOVSZKY et al., 2015), persistentes no ambiente, que apresentam elevada capacidade de lixiviação, e são altamente tóxicos para diversas espécies de invertebrados (MORRISSEY et al., 2015). Áreas úmidas temporárias, como é o caso da lavoura de arroz irrigado, estão dentre os locais de maior risco de contaminação pelos neonicotinóides (MAIN et al., 2016).

Atualmente, o principal neonicotinóide estudado é imidacloprid, o qual representa 66% dos 214 testes de toxicidade com neonicotinóides encontrados na literatura. Das espécies avaliadas, os insetos pertencentes à ordem Ephemeroptera, Trichoptera e Diptera parecem ser os mais sensíveis, enquanto os crustáceos em geral são menos sensíveis (MORRISSEY et al., 2015). Os insetos aquáticos são particularmente vulneráveis aos neonicotinóides. No entanto, ainda há poucos estudos sobre os efeitos biológicos de tiametoxam em peixes, anfíbios e moluscos (ANDERSON et al., 2015). Estudos recentes demonstraram efeitos tóxicos de tiametoxam em crustáceos (*Gammarus kischineffensis*) (UĞURLU et al., 2015; DEMIRCI et al. 2015), *Daphnia magna* e *Americamysis bahia* (USEPA, 2013), peixes das espécies *Channa punctata* (KUMAR et al., 2010), *Cyprinodon variegatus*, *Lepomis macrochirus* e *Oncorhynchus mykiss* e moluscos da espécie *Crassostrea virginica* (USEPA, 2013). Barbee & Stout (2009) observaram uma CL50 de 967 (879-1045) µg L⁻¹ (96h) para *Procambarus*

clarkia em condições laboratoriais e insetos do gênero *Chironomus* sp. apresentaram uma CL50 de 35 (33-38) $\mu\text{g L}^{-1}$ (48h) (USEPA, 2013). Vehovszky et al. (2015) observaram que neonicotinóides inibiram a neurotransmissão colinérgica no sistema nervoso de moluscos da espécie *Lymnaea stagnalis*. Os autores ressaltam que os animais aquáticos, incluindo os moluscos, estão em contato direto com os contaminantes presentes no meio aquático e, dessa forma, podem fornecer um modelo adequado para futuros estudos sobre as consequências comportamentais e neuronais de intoxicação por neonicotinóides.

Estudo recente realizado por Bredeson et al. (2015) encontraram clotianidina, um metabólito tóxico do tiametoxam, em pulgões que se alimentavam de plantas de trigo tratadas com tiametoxam, o que sugere a importância de estudos de efeitos residuais de tiametoxam e seus metabólitos sobre herbívoros. Taillebois et al. (2014) descreveram a síntese de dois novos derivados fluorescentes de tiametoxam e compararam suas toxicidades sobre o afídio *Acyrtosiphon pisum*. Os resultados mostraram que os compostos encontrados apresentaram efeitos tóxicos, os quais atuaram como agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina em insetos.

1.1.2.6 Diflubenzuron

O inseticida fisiológico diflubenzuron atua através da inibição da síntese de quitina, de modo a interferir com a formação da cutícula em insetos. Não possui qualquer atividade sistêmica em plantas e não penetra nos tecidos desta, portanto, insetos sugadores de plantas não são afetados muitas vezes, o que forma a base da sua seletividade. Todos os organismos que sintetizam quitina são sensíveis ao diflubenzuron. Efeitos variáveis foram observados em organismos aquáticos, sendo os moluscos insensíveis e Ephemeroptera larvais e outros juvenis de insetos aquáticos altamente susceptíveis. Entretanto, em diversos ensaios laboratoriais, diflubenzuron e seus principais metabólitos não apresentaram efeitos mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos (INCHEM, 2013).

Este inseticida apresenta alta seletividade para artrópodes e tem sido proposto como substituto para o carbofuran na cultura do arroz na Califórnia. Entretanto, o principal produto de degradação do diflubenzuron parece não ser tóxico para espécies aquáticas. Estudos indicam que diflubenzuron parece não ser persistente no ambiente, com meia vida de 3-35 dias (MABURY & CROSBY, 1996).

Diflubenzuron foi rapidamente fotodegradado na água da lavoura de arroz, principalmente para as formas mais estáveis clorofeniluréia e ácido difluorobenzóico. As

aplicações nas parcelas com plantas de arroz resultaram em rápida dissipação do diflubenzuron (meia-vida de 27,3 horas) em resíduos não persistentes (FISHER & HALL, 1992). O'Halloran et al. (1996) avaliaram mudanças na abundância e riqueza taxonômica de macroinvertebrados após exposição ao diflubenzuron e observaram que Chironomidae e Ephemeroptera foram os grupos mais sensíveis e efeitos não foram observados sobre Mollusca e Oligochaeta.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2015) reúne uma série de informações sobre os efeitos de diflubenzuron em organismos aquáticos não alvos, incluindo anfíbios, crustáceos, peixes e insetos. Em relação aos efeitos sobre os macroinvertebrados, um estudo realizado por Liber et al. (1996) observaram que a exposição de insetos da família Chironomidae ao diflubenzuron em condições de campo resultou em uma EC50 para inibição da emergência dos insetos que variou de de 1,0 para 1,4 μgL^{-1} , sendo que a concentração tóxica máxima estimada para Chironomidae foi de 0,7-0,8 μgL^{-1} . Sendo assim, os autores ressaltam que efeitos significativos sobre a emergência de insetos podem ser esperados quando estes são expostos ao diflubenzuron, em concentrações maiores do que 1,0 μgL^{-1} , sendo que o grau de toxicidade depende da concentração ao qual o organismo é exposto.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 ARTIGO 1

Suficiência amostral para estudos de impacto ambiental sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos em arrozais irrigados

Sample sufficiency for environmental impact studies on benthic macroinvertebrate community in irrigated rice fields

Publicado como nota científica na Revista Ciência Rural

Cienc. Rural vol. 46 n.1 p.26-29 Santa Maria Jan. 2016

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131218>

Alana Cristina Dorneles Wandscheer*¹ Joele Schmitt Baumart² Enio Marchesan¹
Sandro Santos² Luis Antonio de Avila³ Camille Flores Soares¹ Mateus Marques Pires⁴

¹Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-graduação em Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: alanacdw@hotmail.com.

²Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Animal, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação em Biologia, Escola Politécnica, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brasil.

Comentários

A presente nota científica abrangeu 2 anos de pesquisas. O primeiro ano (2008) contempla os resultados obtidos da dissertação de mestrado da autora Joele Schmitt Baumart e o segundo ano (2012) os resultados contemplados na presente tese. Dessa forma, apresentar-se-ão aqui apenas os resultados de 2012.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a suficiência amostral para estudos de impacto ambiental sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos em arrozais irrigados (*Oryza sativa* L.). Amostragens de solo foram realizadas com auxílio de coletor cilíndrico, no ano agrícola 2012/13. As amostras foram triadas e os espécimes identificados até o nível de família. Os dados foram submetidos à análise da curva do coletor e os índices de diversidade de Shannon e equabilidade de Pielou foram calculados para o total de amostras e o número de amostras definido pela curva do coletor, em cada ano amostral. Considerando o método de amostragem verificado no presente trabalho, indica-se um mínimo de 10 réplicas para se obter o maior número de famílias sem perda de informação, quando em estudos de impacto ambiental sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos em área de cultivo de arroz irrigado.

Palavras-chave: curva do coletor, amostragem, índices de diversidade, invertebrados aquáticos.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the sample sufficiency in environmental impact studies on the benthic macroinvertebrate community in irrigated rice fields (*Oryza sativa* L.). Soil samplings were conducted with a cylindrical collector in the agricultural year of 2012/13. Individuals were sorted out and identified up to family level. Data were analyzed through the collector curve, Shannon's Diversity and Pielou's Evenness Index were calculated for the total number of samples and the number of samples defined by the collector curve in each year. Considering the results observed in this study, we indicate a minimum of 10 replicates to obtain the largest number of families without loss of information, in environmental impact studies on benthic macroinvertebrate community in irrigated rice fields.

Key words: collector curve, sampling, diversity indices, aquatic invertebrates.

Macroinvertebrados bentônicos são organismos que habitam os substratos de fundo nos habitats de água doce, ao menos parte do seu ciclo de vida, e que podem ser retidos em

peneira de malha ≥ 200 a $500\mu\text{m}$ (ROSENBERG & RESH, 1993), representados por espécies de Insecta, Annelida, Nemertinea, Crustacea, Mollusca e alguns Turbellaria e Bryozoa (KUHLMANN et al., 2012). Tais organismos ocupam importante posição na fauna aquática dos arrozais irrigados (BARBOUR et al., 1999), auxiliando na fertilidade do solo da lavoura, na ciclagem de nutrientes, além do controle biológico de insetos pragas da cultura (ROGER et al., 1991).

Estudos de impacto ambiental em comunidades aquáticas requerem métodos apropriados para se obter informações precisas sobre mudanças na diversidade e estrutura das comunidades biológicas. A amostragem é necessária porque não é possível acessar a totalidade de um dado universo amostral, sendo necessário avaliar se o tamanho da amostra é suficiente para uma dada precisão requerida e, portanto, a avaliação de suficiência amostral é uma ferramenta importante para este estudo (PILLAR, 2004). Segundo CAIN (1938), a suficiência amostral é atingida quando um incremento de 10% no tamanho da amostra corresponde a um incremento menor ou igual a 10% no número de espécies levantadas.

Segundo SILVA (2012), poucos trabalhos têm sido feitos para determinar a suficiência amostral em estudos com invertebrados do solo. Considerando a necessidade de pesquisas sobre o esforço amostral requerido para estudos de impacto ambiental, o objetivo do presente trabalho foi definir a suficiência amostral requerida para ensaios com macroinvertebrados bentônicos em área de cultivo de arroz irrigado.

O estudo foi realizado em área experimental de várzea, Universidade Federal de Santa Maria, no ano agrícola de 2012/13. Ensaio a campo foi instalado a fim de simular o ambiente da lavoura de arroz irrigado. A parcela experimental apresentou área de 10m^2 , onde foi semeada a cultivar 'PUITA INTA CL'. Amostras de solo foram coletadas após o terceiro dia de entrada de água nas parcelas, as quais permaneceram com lâmina de água de 10 cm.

As coletas de solo seguiram dois transectos que se cruzavam no meio das parcelas, sendo que, em cada transecto, foram coletadas 10 amostras a uma distância de aproximadamente 48 cm. As amostragens foram realizadas com auxílio de um cilindro coletor com área de $0,01\text{ m}^2$ a uma profundidade de 10 cm. Após as coletas, as amostras foram lavadas em tamises de 0,50 mm e acondicionadas em frascos plásticos, coradas com "rosa de Bengala" e fixadas com álcool etílico absoluto. No laboratório, o material foi triado e identificado até o nível taxonômico de família (FERNÁNDEZ & DOMÍNGUEZ, 2001).

A suficiência amostral foi avaliada pela construção da curva do coletor, utilizando-se 100 randomizações. Cada ponto foi considerado uma unidade amostral ($n=20$ amostras). A análise foi realizada no programa estatístico EstimateS 8.2 (COLWELL, 2009). A diversidade

e a abundância proporcional dos organismos foram avaliadas para o número total de amostras coletadas e o número de amostras obtido na análise de suficiência amostral, através dos índices de Shannon (H') e equabilidade de Pielou (J').

Um total de 2205 indivíduos foi coletado, distribuídos nos filos Arthropoda, Annelida, Mollusca e Nematoda. O filo mais abundante foi Arthropoda e a classe mais abundante foi Insecta com duas ordens (Diptera e Coleoptera) e sete famílias, além do subfilo Crustacea (ordem Ostracoda). O filo Annelida foi composto pelas classes Oligochaeta e Hirudinea e corresponderam a aproximadamente 89% dos organismos coletados. O filo Mollusca foi composto pela ordem Basommatophora (família Planorbidae, gênero *Biomphalaria* sp.)

Segundo SILVEIRA (2010), a melhor forma de se avaliar o esforço de amostragem é através da construção da curva do coletor. Este método tem sido muito utilizado no Brasil para indicar a suficiência amostral, um conceito quantitativo para informar se a amostra utilizada é representativa da comunidade em estudo. Quanto maior o tamanho da amostra, maior o número de espécies que poderá ser encontrado, mas a uma taxa decrescente, até o ponto em que a curva estabiliza e torna-se horizontal (SCHILLING & BATISTA, 2008). Uma vez que a assíntota da curva é atingida, nenhuma amostragem adicional produzirá adição de espécies (GOTELLI & COLWELL, 2010).

Com os resultados obtidos, identificou-se que a suficiência amostral para coleta de macroinvertebrados bentônicos foi atingida após 10ª amostra, quando já haviam aparecido os 12 táxons identificados nas amostras (Figura 1).

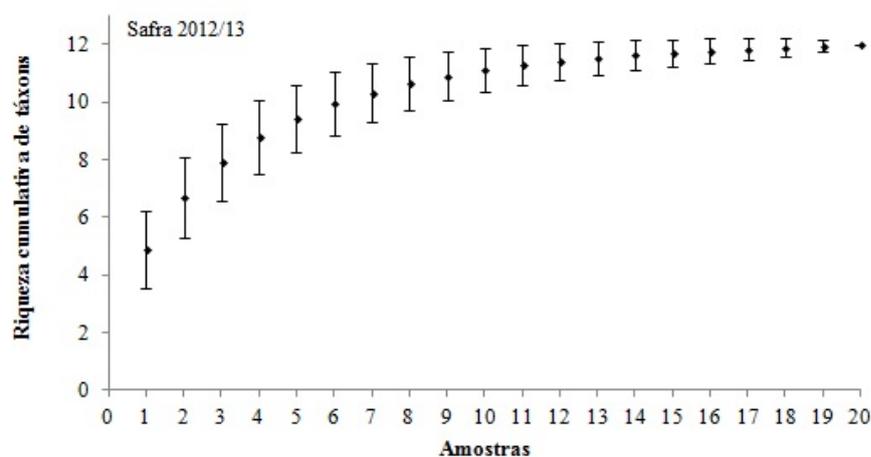


Figura 1 - Curva cumulativa para os táxons encontrados na lavoura de arroz na safra 2012/13. Os pontos expressam a curva cumulativa média, gerada pela adição aleatória das amostras. As barras indicam o desvio padrão. Santa Maria, 2014.

A diversidade é um dos conceitos fundamentais no estudo de comunidades e diversos métodos para sua mensuração estão disponíveis, dentre eles o uso dos índices de diversidade que combinam dois atributos de uma comunidade biológica: o número de espécies e sua equabilidade (MELO et al., 2008).

O índice de diversidade de Shannon (H') e o índice de equabilidade de Pielou (J') apresentaram valores próximos para o número de amostras totais e a suficiência amostral, indicando que a análise da suficiência amostral foi eficaz para uma representação significativa da comunidade de macroinvertebrados bentônicos. O índice de Shannon foi de 0,496 para o número de amostras totais e 0,413 para a suficiência amostral e o índice de equabilidade de Pielou apresentou o valor de 0,199 para o número de amostras totais e 0,166 para a suficiência amostral.

As curvas de acumulação de espécies, bem como os estimadores de riqueza, fornecem subsídios para a tomada de decisões em relação à riqueza taxonômica e a conservação da biodiversidade, sendo ferramentas importantes na adequação do esforço amostral (SILVA, 2012). Considerando o método de amostragem utilizado no presente trabalho, indica-se um número de 10 réplicas para se obter o maior número de famílias sem perda de informação, como suficiência amostral para estudos de impacto ambiental sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos em áreas de cultivo de arroz irrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Edital Universal – MCTI/CNPq n. 14/2012) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

BARBOUR, M.T.; et al. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers. **Periphyton, benthic macroinvertebrates and fish**. 2 ed., New York, 1999. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/monitoring/rsl/bioassessment/>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

CAIN, S.A. The species-area curve. **American Midland Naturalist**. v.119, p.573-581, 1938. Disponível em: <<http://www.jstor.org/discover/10.2307/2420468?uid=3737664&uid=2-&uid=4&sid=21102586723843>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

COLWELL, R.K. **EstimateS**: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Versão 9.0, 2009.

FERNÁNDEZ, H. R.; DOMÍNGUEZ, E. **Guia para la determinación de los artrópodos bentónicos sudamericanos**. Ed. Imprenta Central de la UNT- Tucumán, Argentina. 2001. 289p.

GOTELLI, N. J.; COLWELL, R. K. Estimating species richness. In: MAGURRAN, A. E.; MCGILL, B. J. (Ed.). **Biological Diversity**: Frontiers in measurement and assessment. Oxford: Oxford University Press, 2010, p.39-54.

KUHLMANN, M.L.; et al. **Protocolo para o biomonitoramento com as comunidades bentônicas de rios e reservatórios do estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2012. 113p. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/agua/aguas-superficiais/protocolo-biomonitoramento-2012.pdf>> Acesso em: 15 jul. 2013.

MELO, A.S. O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? **Biota Neotropica**, v.8, n.3, p. 21-27, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/23298>>. Acesso em: 17 out. 2014.

PILLAR, V. DE P. Suficiência amostral. In: BICUDO, C.E. de M.; BICUDO, D. de C. **Amostragem em Limnologia**. São Carlos: RIMA, 2007.

ROGER, P.A. et al. Biodiversity and sustainability of wetland rice production: role and potential of microorganisms and invertebrates. In: HAWKSWORTH, D. L. (Ed.) **The biodiversity of microorganisms and invertebrates**: its role in sustainable agriculture. UK: CAB International, 1991, p. 117-136.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. eds. **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall. 1993. 488p.

SCHILLING, A. C.; BATISTA, J. L. F. Curva de acumulação de espécies e suficiência amostral em florestas tropicais. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n.1, p. 179-187, 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042008000100016> >. Acesso em: 15 out. 2014. doi: 10.1590/S0100-84042008000100016.

SILVA, D.R. de O. e. **Estimativa de riqueza de macroinvertebrados bentônicos e a relação da composição de comunidades com componentes de meso-habitat em riachos de cabeceira no cerrado**. 2012. 65p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre, Universidade Federal de Minas Gerais.

SILVEIRA, L.F. et al. Para que servem os inventários de fauna? **Estudos Avançados**, v.24, n.68, p. 173-207, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000100015>>. Acesso em: 20 out. 2014. doi: 10.1590/S0103-40142010000100015.

2.2 ARTIGO 2

Riqueza e densidade de macroinvertebrados aquáticos bentônicos após exposição a fungicidas e inseticidas da lavoura de arroz irrigado

Alana Cristina Dorneles Wandscheer¹, Enio Marchesan¹, Sandro Santos², Renato Zanella³,
Marilia Ferreira da Silva¹, Guilherme Pilar Londero⁴, Gabriel Donatto¹

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi verificar a riqueza e a densidade da comunidade de macroinvertebrados aquáticos bentônicos após exposição a fungicidas e inseticidas da lavoura de arroz irrigado. Foram instalados dois experimentos de campo, nos anos agrícolas 2012/13 e 2013/14, em área didático experimental de várzea, da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. Em cada ano agrícola, houve a instalação de um experimento de campo constando de seis parcelas experimentais com área total de 10m² cada (4 x 2,5m), sendo cinco parcelas com plantas de arroz e uma parcela sem plantas de arroz, simulando o ambiente natural. Cada parcela experimental recebeu um tratamento: T1: aplicação da formulação comercial contendo os princípios ativos fungicidas trifloxistrobina + tebuconazol (50 + 100 g i.a.ha⁻¹, respectivamente); T2: aplicação do produto comercial contendo o princípio ativo fungicida triciclazol (225 g i.a.ha⁻¹); T3: aplicação da formulação comercial contendo os inseticidas lambda-cialotrina + tiametoxam (15,9 + 21,15 g i.a ha⁻¹, respectivamente); T4: aplicação do produto comercial contendo o princípio ativo inseticida fisiológico diflubenzuron (19,2 g i.a ha⁻¹); T5: controle com plantas de arroz; T6: controle sem plantas de arroz. Os agrotóxicos foram aplicados em dose única sobre as plantas de arroz em estágio R3 ou diretamente sobre a lâmina de água da parcela experimental controle sem plantas de arroz. Amostras de solo foram coletadas para avaliação da riqueza e densidade da fauna de macroinvertebrados bentônicos. Parâmetros físico-químicos da água, tais como temperatura, pH e oxigênio dissolvido e a persistência dos agrotóxicos na água e no solo foram avaliados durante os experimentos. O estabelecimento da comunidade de macroinvertebrados bentônicos é favorecido quando em ambiente natural, livre de agrotóxicos e sem plantas de arroz. Entretanto, a aplicação de apenas uma dose dos fungicidas trifloxistrobina + tebuconazol e triciclazol e dos inseticidas lambda-cialotrina + tiametoxam e diflubenzuron não ocasiona efeitos significativos sobre a riqueza e densidade de macroinvertebrados. Tebuconazol, triciclazol e tiametoxam apresentam elevada persistência na água de irrigação da lavoura de arroz irrigado, sendo necessário o cuidado quanto às doses e número de aplicações destes produtos na lavoura, a fim de evitar a contaminação ambiental.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, agrotóxicos, invertebrados, terras baixas.

¹ Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Animal. Universidade Federal de Santa Maria.

³ Programa de Pós-graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria.

⁴ Dupont do Brasil S/A. Rodovia PLN 145, nº 943, Bairro Boa Esperança. CEP: 13148-080. Paulínia, SP, Brasil.

Introdução

As lavouras de arroz são ambientes com alta diversidade biológica dificilmente encontrada em outras áreas agrícolas (STENERT et al., 2012) e a conservação das espécies nestas áreas pode ser uma importante alternativa para a conservação da biodiversidade em áreas úmidas (MALTCHIK et al., 2011). No entanto, a intensa utilização de agrotóxicos no manejo da cultura do arroz pode ocasionar impactos sobre organismos não alvos, visto que as lavouras de arroz são consideradas ambientes aquáticos temporários que propiciam o desenvolvimento de muitas espécies (BAMBARADENIYA et al., 2004).

O uso de agrotóxicos modifica as teias alimentares e o desenvolvimento das comunidades (MESLÉARD et al., 2005). Tradicionalmente, a avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos é realizada por meio de medições de alterações nas concentrações de variáveis físicas e químicas. Entretanto, esta técnica é pouco eficiente na detecção de alterações de diversidade em habitats e microhabitats e insuficiente na determinação das consequências da alteração da qualidade da água sobre as comunidades biológicas, o que sugere o monitoramento biológico como ferramenta mais confiável na avaliação de respostas das comunidades biológicas às modificações do ambiente (GOULART & CALLISTO, 2003).

A caracterização da comunidade é um bom indicador de mudanças ambientais, em virtude da exposição aos agrotóxicos (LIESS et al., 2008). Neste sentido, para a avaliação do impacto de um agroecossistema, recomenda-se a avaliação de uma comunidade bioindicadora (GAMBOA et al., 2008). Os macroinvertebrados bentônicos estão entre os organismos mais indicados, visto apresentarem abundância populacional e fácil identificação, ampla distribuição nos ecossistemas de água doce e sensibilidade aos fatores de perturbação. Além disso, estes organismos vivem nos sedimentos que tendem a acumular resíduos de agrotóxico, o que potencializa os efeitos desses produtos (GAMBOA et al., 2008).

Diversos fungicidas e inseticidas são atualmente utilizados para o controle de pragas e doenças na cultura do arroz irrigado, dentre eles os principais são aqueles do grupo das estrobilurinas, triazóis, benzotiazóis, piretróides, neonicotinóides e benzoilurías. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a riqueza e a densidade da comunidade de macroinvertebrados aquáticos bentônicos após exposição a fungicidas e inseticidas (trifloxistrobina, tebuconazol, triciclazol, lambda-cialotrina, tiametoxam, diflubenzuron) da lavoura de arroz irrigado. Tais agrotóxicos foram escolhidos em virtude da ampla utilização em áreas de cultivo de arroz irrigado no sul do Brasil.

Material e métodos

O estudo foi conduzido em área didático experimental de várzea da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (latitude -29.7000° , longitude -53.7000° e altitude 95 metros), cidade de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul, no sul do Brasil, uma das maiores regiões produtoras de arroz no mundo, durante dois anos agrícolas, 2012/13 e 2013/14, com a cultura do arroz irrigado.

Em cada ano agrícola, houve a instalação de um experimento de campo constando de seis parcelas experimentais com área total de 10m^2 cada ($4 \times 2,5\text{m}$), sendo cinco parcelas com plantas de arroz e uma parcela sem plantas de arroz, simulando o ambiente natural. Cada parcela experimental recebeu um tratamento: T1: aplicação da formulação comercial contendo os princípios ativos fungicidas trifloxistrobina + tebuconazol ($50 + 100 \text{ g i.a.ha}^{-1}$, respectivamente); T2: aplicação do produto comercial contendo o princípio ativo fungicida triciclazol ($225 \text{ g i.a.ha}^{-1}$); T3: aplicação da formulação comercial contendo os inseticidas lambda-cialotrina + tiametoxam ($15,9 + 21,15 \text{ g i.a ha}^{-1}$, respectivamente); T4: aplicação do produto comercial contendo o princípio ativo inseticida fisiológico diflubenzuron ($19,2 \text{ g i.a ha}^{-1}$); T5: controle com plantas de arroz; T6: controle sem plantas de arroz. Os agrotóxicos foram aplicados apenas uma vez nas parcelas sobre a parte aérea das plantas durante o estágio reprodutivo R3 (exerção da panícula) do arroz, segundo a escala proposta por Counce et al. (2000), e também sobre a lâmina de água na parcela sem plantas de arroz. As aplicações foram realizadas com pulverizador costal propelido a CO_2 (pressão de 40 lbs pol^{-2}) com vazão de 150 L ha^{-1} e auxílio de uma barra com quatro pontas de pulverização cone vazio (Jacto JA-2) espaçadas $0,50 \text{ m}$ e operando em 276 kPa .

As parcelas experimentais foram isoladas por taipas com irrigação e drenagem individuais, a fim de evitar a contaminação com os diferentes agrotóxicos a serem avaliados. Amostragens de macroinvertebrados dentro de cada parcela experimental foram realizadas como repetições, as quais foram definidas pela análise de suficiência amostral, realizada anterior à primeira coleta (WANDSCHEER et al., 2016), sendo 10 amostras por parcela o valor mínimo encontrado.

Para o cultivo do arroz, utilizou-se o cultivar PUITÁ INTA CL, semeado na densidade de 85 Kg ha^{-1} de semente, no sistema de cultivo mínimo. A adubação de base, o nitrogênio de cobertura, o início da irrigação das parcelas e os demais tratos culturais foram conduzidos conforme análise de solo e recomendações técnicas para a cultura do arroz irrigado (SOSBAI, 2012). Quando da irrigação do experimento, as parcelas experimentais permaneceram com

lâmina de água de 0,10 m. Além disso, uma taipa ronda ampla foi construída a fim de evitar as perdas de água por infiltração lateral, mantendo a carga hidráulica das parcelas.

As coletas de solo foram realizadas com auxílio de “Corer” cilíndrico de PVC, com diâmetro de 0,1m, a uma profundidade de 0,1m de solo, em quatro momentos durante o primeiro ano (1 dia antes das aplicações de agrotóxicos (dia 0), 1 dia após as aplicações de agrotóxicos (dia 1), 15 e 30 dias após as aplicações dos agrotóxicos (dias 15 e 30, respectivamente). Para o segundo ano, foi realizada uma coleta adicional aos 7 dias após aplicações dos agrotóxicos (dia 7). Estes dias amostrais foram escolhidos a fim de englobar todo o período de cultivo do arroz.

No campo, as amostras de solo foram armazenadas em sacos plásticos identificados, e então levadas ao laboratório para lavagem em água corrente, através de peneira de malha (0,5 mm) (KUHLMANN et al., 2012). Após a lavagem, as amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos de 1L, onde se adicionou álcool etílico 70°GL e o corante Rosa de Bengala (1L álcool etílico 70°GL: 1 g de corante), de forma que a proporção final foi 1:2 (amostra de solo: corante + álcool etílico 70°GL).

As análises das amostras foram realizadas em duas etapas: triagem e identificação; contagem dos táxons presentes. Na etapa da triagem, as amostras foram lavadas novamente em água corrente para retirada do excesso de corante, e então colocadas em bandejas de fundo branco, com apoio de base iluminadora, para retirada a olho nu dos materiais mais grosseiros e indivíduos maiores. Após, uma análise em lupa foi realizada para a retirada dos indivíduos menores das amostras. Os indivíduos coletados foram identificados sob estereomicroscópio até o menor nível taxonômico possível, utilizando-se bibliografias especializadas (FERNÁNDEZ & DOMÍNGUEZ, 2001; COSTA, et al., 2006; MUGNAI et al., 2010).

Os parâmetros avaliados foram riqueza (número de táxons presentes) e densidade (número de indivíduos por metro quadrado). Parâmetros físico-químicos da água, tais como temperatura, pH e oxigênio dissolvido e persistência dos agrotóxicos foram avaliados no decorrer dos dias amostrais. A concentração dos agrotóxicos na água foi avaliada 5 minutos após a primeira aplicação (dia 0) e 1 dia após (dia 1), 7 dias após (dia 7 – para o segundo ano), 15 e 30 dias após as aplicações dos agrotóxicos (dias 15 e 30). A concentração dos agrotóxicos no solo foi avaliada 1 dia após (dia 1), 7 dias após (dia 7 – para o segundo ano), 15 e 30 dias após as aplicações (dias 15 e 30).

Para a coleta de água 5 minutos após a aplicação dos agrotóxicos (dia 0), utilizou-se recipientes de vidro contendo 250 mL de água ultra-pura, os quais foram colocados dentro das parcelas imediatamente antes das aplicações e recolhidos 5 minutos após as aplicações. Para

as demais amostras de água (dias 1, 7, 15 e 30) foram utilizados recipientes de vidro, os quais foram lavados com solução de limpeza (Extran®) e com a água a ser amostrada. As amostras de solo foram coletadas com auxílio de trado a uma profundidade de 0,1 m. A água e solo coletados durante a realização dos experimentos foram analisados pelo Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP) da UFSM.

Para a determinação da persistência dos agrotóxicos na água, as amostras foram filtradas em membrana de nylon em ésteres de celulose 0,45 µm, e após foram submetidas ao processo de pré-concentração em cartuchos de SPE (Extração em Fase Sólida) contendo 500 mg de C₁₈ seguida da eluição com o solvente de escolha para cada agrotóxico. A análise dos agrotóxicos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detecção por arranjo de diodos (HPLC-MS/MS) (LANCAS, 2004; JARDIM, 2010; CALDAS et al., 2011).

As amostras de solo foram extraídas empregando o método QuEChERS modificado, onde 5 g de solo foram extraídas utilizando 10 mL de acetonitrila acidificada com ácido acético 1% (v/v) seguido de agitação por 1 min. A partição foi realizada utilizando 3 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) e acetato de sódio (CH₃COONa) também seguido de agitação e posterior centrifugação. A limpeza do extrato foi realizada com 2 mL do sobrenadante e 300 mg de MgSO₄ e 125 mg de PSA, agitação e centrifugação. O extrato final obtido foi diluído 5 vezes com água ultrapurificada. A determinação dos agrotóxicos foi realizada no sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em série (HPLC-MS/MS) com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) (PRESTES et al., 2009).

Os dados obtidos dos parâmetros físico-químicos da água e densidade de organismos foram analisados quanto à normalidade de sua distribuição (teste de Shapiro-Wilk) e igualdade de variâncias (teste de Bartlett). Para dados não normais, procedeu-se à transformação dos mesmos (\sqrt{x}) para adequação às análises de variância de dois critérios (ANOVA two-way), que compararam as variáveis (densidade e parâmetros físico-químicos da água) nos tratamentos e ao longo dos dias amostrais (1º fator = tratamentos e 2º fator = dias amostrais). Para complementação da análise, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados de densidade, parâmetros físico-químicos da água e persistência dos agrotóxicos na água foram correlacionados entre si através da análise de correlação linear. O pacote estatístico utilizado para a realização das análises foi BioEstat (5.0) (AYRES et al., 2007).

Resultados

Parâmetros físico-químicos da água

As médias de oxigênio dissolvido na água apresentaram pequena variação entre os dias amostrais em ambos os anos agrícolas. Para o primeiro ano, as médias variaram de 8,9 a 6,4 mg.L⁻¹ (Tabela 1) sendo os maiores valores constatados no 15º dia após as aplicações dos agrotóxicos. Para o segundo ano, as médias variaram de 7,9 a 5,6 mg L⁻¹, sendo os maiores valores registrados no 7º dia após as aplicações dos agrotóxicos. Não foram observados efeitos dos tratamentos sobre o oxigênio dissolvido na água das parcelas experimentais, para os dois anos de estudo.

A temperatura da água variou de 35,6 a 26,2 °C no primeiro ano, sendo significativamente maior no dia da aplicação dos agrotóxicos. No segundo ano, variou de 38,5 a 26,6 °C, sendo mais elevada no 30º dia após as aplicações dos agrotóxicos, em comparação aos demais dias amostrais. A temperatura da água foi também significativamente maior no tratamento controle sem a presença de plantas de arroz (T6), já que neste ambiente a ausência do dossel das plantas de arroz permitiu maior entrada de luz, favorecendo o aumento da temperatura da água.

O pH da água variou de 8,7 a 6,2 no primeiro ano e 6,9 a 6,1 no segundo ano, não havendo diferença estatística entre tratamentos e dias amostrais para os dois anos de estudo.

Pode-se observar correlação negativa significativa do oxigênio dissolvido com a temperatura da água, a qual foi constatada no T3 e no T6, para o primeiro ano de estudo, e T1, T2, T3 e T4, no segundo ano. O pH também esteve positivamente correlacionado com a temperatura em T1, T3 e T5, no segundo de estudo.

Persistência dos agrotóxicos na água e solo

Trifloxistrobina foi detectada na água até 1 dia após as aplicações dos agrotóxicos, não sendo detectada no solo, para os dois anos de estudo (Tabela 2). Tebuconazol, por sua vez, foi encontrado na água até 30 dias após as aplicações, nos dois anos, e em baixa concentração (0,01 mg.Kg⁻¹) no solo no segundo ano, 1 dia após as aplicações. Também foi observada correlação positiva significativa da temperatura da água com as concentrações de trifloxistrobina e tebuconazol e destes entre si.

Triciclazol apresentou o mesmo comportamento de tebuconazol, sendo detectado na água até 30 dias após as aplicações, não sendo, entretanto, encontrado no solo, nos dois anos amostrais.

Lambda-cialotrina foi detectada na água apenas na primeira avaliação, 5 minutos após as aplicações, não sendo encontrada no solo, nos dois anos de estudo. Resíduos do princípio ativo tiametoxam foram detectados na água do primeiro ano até 1 dia após as aplicações, no entanto, foram detectados até os 30 dias após as aplicações no segundo ano, não sendo encontrados no solo nos dois anos. Observaram-se correlação positiva significativa de lambda-cialotrina e tiametoxam na água, para os dois anos (Tabelas 5 e 6).

Da mesma forma que lambda-cialotrina, diflubenzuron foi detectado na água apenas na primeira avaliação 5 minutos após as aplicações, no primeiro ano e, para o segundo ano, foi detectado até 15 dias após as aplicações, sendo também encontrado no solo 1 dia após as aplicações, a uma concentração de $5,9 \text{ mg.Kg}^{-1}$. No primeiro ano, observou-se correlação positiva significativa da concentração de diflubenzuron com o pH da água.

Macroinvertebrados aquáticos bentônicos

Quatro filos foram identificados nas amostras: Arthropoda, Annelida, Nematoda e Mollusca. O filo Arthropoda foi composto pela classe Insecta, ordem Diptera (famílias Chironomidae, Ceratopogonidae e Tipulidae), Odonata (famílias Libellulidae e Coenagrionidae), Coleoptera (famílias Dryopidae, Noteridae, Curculionidae – larvas e adultos, Ditiscidae – larvas e adultos, Gyrinidae e Hydrophilidae), Tricoptera (família Hydroptilidae), Lepdoptera, Hemiptera (família Veliidae); classe Entognatha (ordem Collembola) e pelo Sub-filo Crustacea, classe Ostracoda. O filo Annelida foi composto por duas classes: Oligochaeta e Hirudinea, e o filo Mollusca foi composto pela classe Gastropoda, ordem Mesogastropoda (família Ampularidae, gênero *Pomacea* sp.) e Basommatophora (família Planorbidae, gênero *Biomphalaria* sp.) (Tabela 3).

No primeiro ano de estudo, foi encontrada uma densidade total de 8.827 org./m², para todos os tratamentos e dias amostrais, em comparação a 2.454 org./m² encontrada no segundo ano de estudo. Houve diferença significativa para densidade entre tratamentos, porém, não houve para dias amostrais, nos dois anos (Tabela 4).

Pode-se observar que em ambos os anos, houve maior densidade de organismos bentônicos no tratamento controle sem plantas de arroz (T6), em comparação aos demais tratamentos, com plantas de arroz. Para o primeiro ano, a densidade foi menor nos tratamentos T1, T2 e T3, porém, não diferiram de T4 e T5 (controle), os quais apresentaram uma densidade média semelhante. No segundo ano, todos os tratamentos, exceto controle sem plantas de arroz (T6), apresentaram densidade semelhante entre si.

Não houve correlação significativa entre as densidades de organismos e as concentrações dos agrotóxicos na água, para os dois anos de estudo. No primeiro ano, houve correlação significativa da densidade de organismos no T1 com o oxigênio dissolvido na água. O contrário foi observado para o T5 (controle), onde a densidade apresentou correlação negativa significativa com o oxigênio, o que pode ter ocorrido em função da elevação na temperatura da água, favorecendo o aumento na densidade e ocasionando redução no oxigênio dissolvido, não sendo, entretanto, uma redução drástica, com níveis adequados ao desenvolvimento dos organismos.

Discussão

Constatou-se que a aplicação dos agrotóxicos não alterou as propriedades físico-químicas da água das parcelas experimentais, visto que todos os parâmetros avaliados mantiveram-se em níveis adequados para o desenvolvimento dos organismos. O oxigênio que provém da atmosfera dissolve-se nas águas naturais devido à diferença de pressão parcial. Os níveis de oxigênio dissolvido indicam a capacidade de um corpo d'água natural em manter a vida aquática (CETESB, 2009). Segundo Esteves (1998), o oxigênio dissolvido é fundamental para o desenvolvimento das comunidades aquáticas, sendo que as concentrações desse gás definem as condições de habitabilidade nos ecossistemas. A correlação negativa significativa do oxigênio dissolvido na água com a temperatura ocorreu devido ao fato que a solubilidade dos gases em água diminui com a elevação da temperatura (FIORUCCI & BENEDETTI FILHO, 2005). Piedras et al. (2006) verificaram que a abundância de oligoquetas foi relacionada com a diminuição na concentração de oxigênio dissolvido na água, que é característica de locais impactados por poluição orgânica.

Estudos anteriores na mesma área experimental refletiram em taxas menores de oxigênio dissolvido, sendo que Golombieski et al. (2008) observaram valores de 0,6 - 2,2 mg. L⁻¹ e Reimche et al. (2008) encontraram valores de 2,4 – 4,6 mg. L⁻¹, o que indica boas condições de oxigênio dissolvido na água nos anos estudados. Os valores de pH da água mantiveram-se adequados para este tipo de ambiente, segundo a Resolução CONAMA 357/2005, o qual não deve estar abaixo de 6,0 (BRASIL, 2005).

Embora não tenham sido observados efeitos significativos dos agrotóxicos sobre a densidade de organismos bentônicos, tebuconazol, triciclazol e tiametoxam apresentaram persistência na água até 30 dias após sua aplicação. Estudos mostram que a meia-vida de tebuconazol em condições naturais foi de aproximadamente 100 dias, não sendo evidenciada fotólise em água (SCHOLZE, 2006). A fotodegradação é uma rota improvável de degradação

de tebuconazol no ambiente, visto que em condições naturais ocorre muito lentamente devido à absorção ser muito baixa em comprimentos de onda acima de 290 nm (FAO, 1994). Estudos recentes identificaram aproximadamente 22 produtos de transformação conhecidos e 12 produtos de transformação ainda desconhecidos da degradação de tebuconazol no solo (STORCK et al., 2015). Da mesma forma, a enantiosseletividade é um processo que tem sido estudado recentemente e que pode contribuir para a toxicidade no ambiente natural. A enantiosseletividade de tebuconazol foi avaliada sobre *Scenedesmus obliquus*, *Daphnia magna* e *Danio rerio*, sendo que R - (-) - tebuconazol foi 1,4 a 5,9 vezes mais tóxico que o S - (+) - tebuconazol (LI et al., 2015). Entretanto, este processo parece estar relacionado com as propriedades do solo (LI et al., 2015) e até então nenhuma degradação enantiosseletiva significativa foi observada para tebuconazol em condições esterilizadas (ZHANG et al., 2015), mostrando a importância da matéria orgânica na degradação enantiosseletiva do fungicida.

Triciclazol é considerado um fungicida persistente no ambiente, com alto risco de contaminação ambiental (PADOVANI et al., 2006). A dissipação de penoxsulam, triciclazol e profoxidim em arrozais foi verificada em condições de laboratório e campo, sendo que triciclazol foi o agrotóxico mais persistente com DT50 de 44,5 – 84,6 dias no campo e 197 dias em laboratório (TSOCHATZIS et al., 2013). García-Jaramillo et al. (2014) observaram que a matéria orgânica apresenta papel importante na adsorção de triciclazol às partículas do solo. A máxima adsorção e a mínima dessorção de triciclazol foi observada em solos com elevado conteúdo de carbono orgânico e argila, mostrando que a contaminação dos lençóis subterrâneos pode ser minimizada quando se aplica triciclazol em áreas de cultivo de arroz que apresente solo com tais características (KUMAR et al., 2015).

O princípio ativo tiametoxam pertence à classe dos neonicotinóides, os quais são considerados persistentes no ambiente, com elevada capacidade de lixiviação, e altamente tóxicos para diversas espécies de invertebrados (MORRISSEY et al., 2015). No presente estudo, tiametoxam apresentou elevada persistência na água, sendo detectado até 30 dias após sua aplicação, não sendo, entretanto, detectados resíduos no solo. Tais resultados corroboram com Scorza Júnior & Rigitano (2012), os quais citam que tiametoxam apresenta alta solubilidade em água e baixa sorção ao solo. Resultados obtidos na mesma área experimental observaram a presença de tiametoxam na água de irrigação do arroz até 40 dias após sua aplicação (TELÓ et al., 2015). Main et al. (2016) citam que áreas úmidas temporárias, como é o caso da lavoura de arroz irrigado, estão dentre os locais de maior risco de contaminação pelos neonicotinóides.

Da densidade total de organismos bentônicos coletados nos dois anos amostrais, observou-se que mais de 75% foi registrado no primeiro ano de estudo. O pouco revolvimento do solo no cultivo do arroz irrigado na safra anterior ao primeiro ano pode ter favorecido o estabelecimento das espécies nesse período, pois no segundo ano do experimento, a construção de taipas do primeiro ano, a destruição das taipas e o aplainamento do solo para pousio no inverno e a construção de taipas novamente para o segundo ano de experimento, podem ter contribuído na diminuição de áreas alagadas para o estabelecimento dos organismos. Além disso, o clima também pode ter favorecido a colonização no primeiro ano, visto que neste período, a temperatura média da água foi menor em comparação ao segundo ano (aproximadamente 1°C), e uma maior taxa de oxigênio dissolvido na água (média geral de 7,3 mg.L⁻¹ para o primeiro ano e 6,9 mgL⁻¹ no segundo ano) foi verificada. Segundo Willming et al. (2013), flutuações na temperatura podem influenciar na habilidade dos organismos em detoxificar xenobióticos, alterando a absorção de contaminantes, as taxas de eliminação e biotransformação, resultando em alterações na toxicidade e nos processos de toxicodinâmica dos agrotóxicos nos organismos. Camargo (2010) cita que as oscilações diárias de temperatura podem não representar estresse para organismos bentônicos em habitats maiores e mais estáveis que a lavoura de arroz. No entanto, para esse agroecossistema, tais mudanças podem ser drásticas o suficiente para dificultar o estabelecimento de indivíduos estrategistas K e, dessa forma, impedir um avanço no processo sucessional.

A riqueza da fauna de macroinvertebrados verificada na presente pesquisa foi semelhante à encontrada por outros autores em lavouras de arroz no Brasil (MOLOZZI et al., 2007; BAUMART & SANTOS, 2011), onde insetos dípteros da família Chironomidae foram dominantes em relação aos demais táxons. A significativa abundância de insetos das famílias Chironomidae e Ceratopogonidae está associada ao fato de que tais organismos são considerados resistentes às condições ambientais de depleção de oxigênio e perturbações associadas ao manejo da cultura do arroz (MOLOZZI et al., 2007). Organismos extremamente tolerantes representados por larvas de Chironomidae e outros Diptera e por toda a classe Oligochaeta são capazes de viver em condição de anóxia por várias horas, além de serem detritívoros, alimentando-se de matéria orgânica depositada no sedimento, o que favorece a sua adaptação a vários ambientes (GOULLART & CALLISTO, 2003). Suhling et al. (2000) destacam que altas densidades de Chironomidae, Oligochaeta e Mollusca são comuns em lavouras de arroz irrigado e a baixa densidade de EPT é devido às aplicações de inseticidas e as altas concentrações de nitrogênio e fósforo no solo.

A maior densidade total de organismos no tratamento controle sem plantas de arroz (T6) em comparação aos demais tratamentos, ocorreu em vista da elevada densidade de dípteros das famílias Chironomidae e Ceratopogonidae, odonatas e larvas de Curculionidae neste tratamento. Observou-se que neste tratamento, devido à ausência de plantas de arroz, houve maior incidência de macrófitas aquáticas, criando um ambiente apropriado para estas espécies. A presença de macrófitas aquáticas favorece a alta densidade de Chironomidae em ambientes lânticos (ROSIN & TAKEDA, 2007; DORNFELD & FONSECA-GESSNER, 2005) e, para odonatas, pode fornecer um hábitat adequado para as ninfas. Importante destacar também a presença de tricópteros da família Hydroptilidae, no segundo ano, com maior densidade no tratamento controle com plantas de arroz, os quais são considerados sensíveis à poluição ambiental (MOLOZZI et al., 2007).

Observou-se que os agrotóxicos estudados não reduziram significativamente a densidade de organismos em comparação aos tratamentos controles. Isto pode ter ocorrido em virtude de que apenas uma aplicação de fungicida ou inseticida ocorreu em cada parcela nos dois anos experimentais, sendo que alguns dos agrotóxicos testados apresentaram baixa persistência na água e no solo e, aqueles com maior persistência (tebuconazol, triciclazol e tiametoxam) podem não ter atingido uma concentração suficiente para causar impactos negativos sobre os indivíduos ou degradado rapidamente em função das condições ambientais. Da mesma forma que o presente trabalho, Rossaro et al. (2014) não verificaram efeitos negativos significativos do fungicida triciclazol sobre a comunidade de macroinvertebrados aquáticos. No entanto, os autores observaram uma baixa diversidade, a qual atribuiu ao curto período de submersão do arroz, bem como ao baixo teor de oxigênio e elevada temperatura da água durante o experimento. Mesléard et al. (2005) compararam comunidades de macroinvertebrados em lavouras de arroz de cultivo orgânico e convencional na França, não encontrando diferenças estatísticas na riqueza e sim na abundância de espécies, que estava correlacionada com a utilização do inseticida fipronil, utilizado anteriormente para o controle de larvas de Chironomidae.

De forma semelhante ao presente trabalho que, em nível menor, objetivou comparar em parcelas experimentais a riqueza e densidade de macroinvertebrados em um manejo de arroz sem agrotóxicos e com utilização de agrotóxicos e áreas sem a presença de plantas de arroz, simulando o ambiente natural, foram observados os mesmos resultados que estudo recente desenvolvido por Dalzochio et al. (2016), porém, em lagoas naturais e lavouras de arroz com cultivo convencional e orgânico. Os autores encontraram que a riqueza e abundância de macroinvertebrados foram maiores nas lagoas naturais em comparação às

lavouras de arroz, no entanto, lavouras com cultivo de arroz orgânico e convencional mostraram abundância e riqueza taxonômica semelhante. Também observaram que muitos taxa só ocorreram em culturas orgânicas e lagoas, o que demonstra que a gestão orgânica da lavoura de arroz favorece o estabelecimento de alguns taxa que são encontrados apenas em ambientes naturais.

CONCLUSÃO

O estabelecimento da comunidade de macroinvertebrados bentônicos é favorecido quando em ambiente natural, livre de agrotóxicos e sem plantas de arroz. Entretanto, a aplicação de apenas uma dose dos fungicidas trifloxistrobina + tebuconazol e triciclazol e dos inseticidas lambda-cialotrina + tiametoxam e diflubenzuron não ocasiona efeitos significativos sobre a riqueza e densidade de macroinvertebrados. Tebuconazol, triciclazol e tiametoxam apresentam elevada persistência na água de irrigação da lavoura de arroz irrigado, sendo necessário o cuidado quanto às doses e número de aplicações destes produtos na lavoura, a fim de evitar a contaminação ambiental.

Referências

- AYRES, M.; AYRES JR., M. AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0**. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá (MCT). Imprensa Oficial do Estado do Pará. 2007.
- BAMBARADENIYA, C.N.B.; EDIRISINGHE, J.P.; SILVA, D.N. de.; GUNATILLEKE, C.V.S.; RANAWANA, K.B.; WIJEKOON, S. Biodiversity associated with an irrigated rice agro-ecosystem in Sri Lanka. **Biodiversity and Conservation**, v.13, n. 9, p.1715-1753, 2004.
- BAUMART, J.S.; SANTOS, S. The impact of herbicides on benthic organisms in flooded rice fields in Southern Brazil. In: **Herbicides and Environmental**. Edited by Andreas Kortekamp. Intech, p.369-382, 2011.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, 18 março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 15/10/13.
- CALDAS, S. S.; GONCALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R., Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduo de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1604- 1617, 2011.
- CAMARGO, B. V. **Macroinvertebrados da lavoura de arroz irrigado tratada com os agrotóxicos carbofuran e penoxsulam**. 2010. 47f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo - Serie Relatos**: significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem. 44p. 2009.

COSTA, C.; IDE, S.; SIMONKA, C.C. **Insetos imaturos**: metamorfose e identificação. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2006. 249p.

DALZUCHIO, M.S.; BALDIN, R.; STENERT, C.; MALTCHIK, L. Can organic and conventional agricultural systems affect wetland macroinvertebrate taxa in rice fields? **Basic and Applied Ecology**, v.17, n.3, p.220-229, 2016.

DORNFELD, C. B.; FONSECA-GESSNER, A. A. Fauna de Chironomidae (Diptera) associada à *Salvinia* sp. e *Myriophyllum* sp. num reservatório do Córrego do Espriado, São Carlos, São Paulo, Brasil. **Entomol. Vect.**, v.12, n.2, p.181-192, 2005.

COUNCE, P.A. KEISLING, T.C.; MITCHELL, A.J. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 436-443, 2000.

ESTEVEZ, F. de A. **Fundamentos de Limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro : Interciência. 226p. 1998.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 1994. Pesticides residues in food: Tebuconazole (188). Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation94/tebucona.pdf. Acesso em: 10 Out. 2015.

FERNÁNDEZ, H. R.; DOMÍNGUEZ, E. **Guia para La determinación de los artrópodos bentónicos sudamericanos**. Ed. Imprenta Central de la UNT- Tucumán, Argentina. 2001. 289p.

FIORUCCI, A.R.; BENEDETTI FILHO, E. A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos. **QNEsc**, v.22, p.10-16, 2005.

GAMBOA, M.; REYES, R.; ARRIVILLAGA, J. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de salud ambiental. **Boletín de Malariologia y Salud Ambiental**, v.48, n.2, p.109-120, 2008.

GARCÍA-JARAMILLO, M.; COX, L.; CORNEJO, J.; HERMOSÍN, M.C. Effect of soil organic amendments on the behavior of bentazone and tricyclazole. *Science of The Total Environment*, v. 466–467, p. 906-913, 2014.

GOLOMBIESKI, J.I.; MARCHESAN, E.; BAUMART, J.S.; REIMCHE, G.B.; RESGALLA JÚNIOR, C.; STORCK, L.; SANTOS, S. Cladocera, Copepods and Rotifers in rice-fish culture handled with metsulfuron-methyl and azimsulfuron herbicides and carbofuran insecticide. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p. 2097-2102, 2008.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, n.1, 2003.

JARDIM, I.C.S.F. Extração em fase solida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fase solidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p.13-25, 2010.

KUHLMANN, M.L.; JOHNSCHER-FORNASARO, G.; OGURA, L.L.; IMBIMBO, H. R. B. **Protocolo para o biomonitoramento com as comunidades bentônicas de rios e reservatórios do estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2012. 113p.

KUMAR, V. A., JANAIHAH, C.; VENKATESHWARLU, P. Effect of thiamethoxam alters serum biochemical parameters in *Channa punctatus* (Bloch). **Asian J. Biosci.**, v.5, n.1, p.106-110, 2010.

LANCAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos, Ed. RiMa, 4 ed. 2004.

LI, Y. DONG F., LIU X., XU J., HAN Y., ZHENG Y. Enantioselectivity in tebuconazole and myclobutanil non-target toxicity and degradation in soils. **Chemosphere**, v.122, p.145-153, 2015.

LISS, M.; SCHÄFER, R.B.; SCHRIEVER, C.A. The footprint of pesticide stress in communities-species traits reveal community effects of toxicants. **Science of the total Environment**, v.406, n.3, p. 484-490, 2008.

MAIN, A.R. MICHEL, N. L.; CAVALLARO, M. C.; HEADLEY, J. V.; PERU, K. M.; MORRISSEY, C. A. Snowmelt transport of neonicotinoid insecticides to Canadian Prairie wetlands. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 215, p.76-84, 2016.

MALTCHIK, L.; ROLON, A.S.; STENERT, C.; MACHADO, I.F.; ROCHA, O. Can rice field channels contribute to biodiversity conservation in Southern Brazilian wetlands? **Revista de Biología Tropical**, v. 59, n.4, p.1895-1914, 2011.

MESLÉARD, F.; GARNERO, S.; BECK, N.; ROSECCHI, E. Uselessness and indirect negative effects of an insecticide on rice field invertebrates. **Comptes Rendus Biologies**, v.328, n.10-11, p.955-962, 2005.

MOLOZZI, J.; HEPP, L. U.; DIAS, A. DA S. Influence of rice crop on the benthic community in Itajaí Valley (Santa Catarina, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.19, n.4, p. 383-392, 2007.

MORRISSEY, C.A. MINEAUC, P.; DEVRIESD, J. H.; SANCHEZ-BAYOE, F.; LISSF, M.; CAVALLAROB, M. C.; LIBERB, K. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. **Environment International**, v. 74, p.291-303, 2015.

MUGNAI, R.; NESSIMIAN, J.L.; BAPTISTA, D.F. **Manual de identificação de macroinvertebrados aquáticos do estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. 176p

PADOVANI, L.; CAPRI, E.; PADOVANI, C.; PUGLISI, E.; TREVISAN, M. Monitoring tricyclazole residues in rice paddy watersheds. **Chemosphere**, v.62, n.2, p.303-314, 2006.

PIEDRAS, S. R. N.; BAGER, A.; MORAES, P.R.R.; ISOLDI, L.A.; FERREIRA, O.G.L.; HEEMANN, C. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores de qualidade de água na Barragem Santa Bárbara, Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.494-500, 2006.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n.

6, p.1620-1634, 2009.

REIMCHE, G.B.; MACHADO, S.L. de O.; GOLOMBIESKI, J.I.; BAUMART, J.S.; BRAUN, N.; MARCHESAN, E.; ZANELLA, R. Persistência na água e influência de herbicidas utilizados na lavoura arrozeira sobre a comunidade zooplanctônica de Cladocera, Copepoda e Rotifera. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.7-13, 2008.

ROSIN, G. C.; TAKEDA, A. M. Larvas de Chironomidae (Diptera) da planície de inundação do alto rio Paraná: distribuição e composição em diferentes ambientes e períodos hidrológicos. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v.29, n.1, p. 57-63, 2007.

ROSSARO, B., MARZIALI, L., CORTESI, P. The Effects of Tricyclazole Treatment on Aquatic Invertebrates in a Rice Paddy Field. **Clean – Soil, Air, Water**. v.42, n.1, p. 29–35, 2014.

SCHOLZE, J.G. **Produção de defensivos agrícolas: melhorias na síntese e fabricação do tebuconazol na Milenia Agrociências S.A.** 2006. 88f. Dissertação (Mestrado Profissional – Petroquímica e Polímeros) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SCORZA JÚNIOR, R.P.; RIGITANO, R.L.O. Sorção, degradação e lixiviação do inseticida tiametoxam em dois solos do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.5, p.564-572, 2012.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO - SOSBAI. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 29., Gravatal, 201 2. 176p.

STENERT, C. MALTCHIK, L.; ROCHA, O. Diversity of aquatic invertebrates in rice fields in southern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v.7, n.1, p.67-77, 2012.

STORCK, V. LUCINI L., MAMY L., FERRARI F., PAPADOPOULOU E. S., NIKOLAKI S., KARAS P. A., SERVIEN R., KARPOUZAS D. G., TREVISAN M., BENOIT P., MARTIN-LAURENT F. Identification and characterization of tebuconazole transformation products in soil by combining suspect screening and molecular typology. **Environmental Pollution**, In Press, Corrected Proof, 2015.

SUHLING, F.; BEFELD, S.; HÄUSLER, M.; KATZUR, K.; LEPKOJUS, S.; MESLÉARD, F. Effects of insecticide applications on macroinvertebrate density and biomass in rice-fields in the Rhône-delta, France. **Hydrobiologia**, v.431, p.69-79, 2000.

TELÓ, G. M.; MARCHESAN, E.; ZANELLA, R.; OLIVEIRA, M. L. DE; COELHO, L.L.; MARTINS, M.L. Residues of Fungicides and Insecticides in Rice Field. **Agronomy Journal**, v.107, n.3, p.851-863, 2015.

TSOCHATZIS, E. D., TZIMOU-TSITOURIDOU, R., MENKISSOGLU-SPIROUDI, U., KARPOUZAS, D.G., KATSANTONIS, D. Laboratory and field dissipation of penoxsulam, tricyclazole and profoxydim in rice paddy systems. **Chemosphere**, v.91, n.7, p. 1049-1057, 2013.

WANDSCHEER, A.C.D.; BAUMART, J.S.; MARCHESAN, E.; SANTOS, S.; AVILA, L.A. de; SOARES, C.F.; PIRES, M.M. Suficiência amostral para estudos de impacto ambiental sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos em arrozais irrigados. **Ciência Rural**, v.46, n.1, p.26-29, 2016.

WILLMING, M. M., QIN, G., MAUL, J. D. Effects of environmentally realistic daily temperature variation on pesticide toxicity to aquatic invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 12, p.2738-2745, 2013.

ZHANG, Q., ZHOU, L., YANG Y., HUA X., SHI H., WANG, M. Study on the stereoselective degradation of three triazole fungicides in sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 117, p. 1-6, 2015.

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos da água. OD: oxigênio dissolvido; pH: potencial hidrogeniônico; T: temperatura; T1 – trifloxistrobina + tebuconazol; T2 – triciclazol; T3 – lambda-cialotrina + tiametoxam; T4 – diflubenzuron; T5 – controle com plantas de arroz; T6 – controle sem plantas de arroz; dia 0: 1 dia antes das aplicações de agrotóxicos; dia 1: 1 dia após as aplicações de agrotóxicos; dia 7: 7 dias após as aplicações de agrotóxicos; dia 15: 15 dias após as aplicações de agrotóxicos; dia 30: 30 dias após as aplicações de agrotóxicos.

| OD (mg L ⁻¹) | | | | | | |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Safrá 2012/13 | | | | | | |
| | T1 (ns) | T2 (ns) | T3 (ns) | T4 (ns) | T5 (ns) | T6 (ns) |
| dia 0 (ab)* | 7.2 | 7.4 | 6.9 | 7.1 | 7.2 | 6.9 |
| dia 1 (b) | 6.9 | 6.8 | 6.4 | 6.7 | 7.2 | 7 |
| dia 15 (a) | 7.1 | 6.6 | 8.9 | 8.6 | 8.2 | 7.5 |
| dia 30 (ab) | 7.4 | 8.1 | 7.4 | 7.4 | 7.5 | 7.1 |
| Safrá 2013/14 | | | | | | |
| | T1 (ns) | T2 (ns) | T3 (ns) | T4 (ns) | T5 (ns) | T6 (ns) |
| dia 0 (ab) | 7.3 | 7.2 | 7.6 | 7.3 | 7.6 | 7.7 |
| dia 1 (b) | 6.4 | 6.7 | 6.7 | 6.5 | 7.1 | 6.7 |
| dia 7 (a) | 7.7 | 7.7 | 7.9 | 7.7 | 7.7 | 7.4 |
| dia 15 (b) | 6.9 | 6.3 | 6.7 | 6.6 | 7.3 | 6.2 |
| dia 30 (c) | 6.2 | 5.6 | 6.3 | 6.2 | 6 | 6.4 |
| pH | | | | | | |
| Safrá 2012/13 | | | | | | |
| | T1 (ns) | T2 (ns) | T3 (ns) | T4 (ns) | T5 (ns) | T6 (ns) |
| dia 0 (ns) | 7.1 | 6.9 | 6.8 | 6.9 | 6.9 | 7.2 |
| dia 1 (ns) | 6.3 | 6.8 | 6.8 | 6.6 | 6.4 | 8.7 |
| dia 15 (ns) | 6.7 | 6.2 | 6.4 | 6.5 | 6.6 | 6.8 |
| dia 30 (ns) | 6.3 | 6.8 | 6.4 | 6.6 | 6.5 | 6.7 |
| Safrá 2013/14 | | | | | | |
| | T1 (ns) | T2 (ns) | T3 (ns) | T4 (ns) | T5 (ns) | T6 (ns) |
| dia 0 (ns) | 6.4 | 6.7 | 6.2 | 6.5 | 6.1 | 6.7 |
| dia 1 (ns) | 6.6 | 6.9 | 6.4 | 6.2 | 6.3 | 6.3 |
| dia 7 (ns) | 6.3 | 6.8 | 6.4 | 6.5 | 6.2 | 6.2 |
| dia 15 (ns) | 6.9 | 6.7 | 6.8 | 6.6 | 6.4 | 6.7 |
| dia 30 (ns) | 6.8 | 6.3 | 6.9 | 6.1 | 6.4 | 6.2 |
| T (°C) | | | | | | |
| Safrá 2012/13 | | | | | | |
| | T1 (B) | T2 (B) | T3 (B) | T4 (B) | T5 (B) | T6 (A) |
| dia 0 (a) | 35 | 32.8 | 31.3 | 31.4 | 32 | 35.6 |
| dia 1 (b) | 27.2 | 31.2 | 28.1 | 28.3 | 28.6 | 35.2 |
| dia 15 (b) | 26.2 | 29.2 | 29 | 29 | 28.5 | 33 |
| dia 30 (b) | 28 | 27.5 | 29.4 | 29.5 | 29.7 | 34.6 |
| Safrá 2013/14 | | | | | | |
| | T1 (B) | T2 (B) | T3 (B) | T4 (B) | T5 (B) | T6 (A) |
| dia 0 (c) | 27.2 | 27.7 | 27.1 | 27.2 | 26.6 | 31.6 |
| dia 1 (b) | 31.2 | 31.1 | 31.2 | 31 | 30.8 | 35.9 |
| dia 7 (c) | 27.5 | 27.6 | 27.5 | 27.7 | 27.6 | 31.3 |
| dia 15 (b) | 31.8 | 32.3 | 32.3 | 32.4 | 32.6 | 34.4 |
| dia 30 (a) | 34.6 | 34.9 | 34.3 | 34.8 | 33.8 | 38.5 |

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Ns: não significativo.

Tabela 2 – Concentração dos agrotóxicos na água ($\mu\text{g L}^{-1}$) e no solo (mg. Kg^{-1}). dia 0: 5 minutos após as aplicações de agrotóxicos; dia 1: 1 dia após as aplicações de agrotóxicos; dia 7: 7 dias após as aplicações de agrotóxicos; dia 15: 15 dias após as aplicações de agrotóxicos; dia 30: 30 dias após as aplicações de agrotóxicos. LOQ: limite de quantificação do método; nd: não detectado.

| Safrá 2012/13 | | | | | | | | | | | |
|---------------|-------------------|-----------------------------------------------|------|-----|-----|-----|-----------------------------------------------|------|-----|-----|-----|
| | | Concentração na água ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | | | | Concentração no solo (mg. Kg^{-1}) | | | | |
| | | Dias amostrais | | | | | Dias amostrais | | | | |
| Tratamento | Princípio ativo | 0 | 1 | 7 | 15 | 30 | 0 | 1 | 7 | 15 | 30 |
| T1 | Trifloxistrobina | 22,6 | 1,4 | - | n.d | n.d | - | n.d | - | n.d | n.d |
| T1 | Tebuconazol | 78,4 | 16,4 | - | 4,2 | 3,8 | - | 0,01 | - | n.d | n.d |
| T2 | Triciclazol | 192,9 | 36,7 | - | 4,1 | 3,4 | - | n.d | - | n.d | n.d |
| T3 | Lambda-cialotrina | 1,6 | n.d | - | n.d | n.d | - | n.d | - | n.d | n.d |
| T3 | Tiametoxam | 21,2 | <LOQ | - | n.d | n.d | - | n.d | - | n.d | n.d |
| T4 | Diflubenzuron | 109,4 | n.d | - | n.d | n.d | - | n.d | - | n.d | n.d |
| Safrá 2013/14 | | | | | | | | | | | |
| | | Concentração na água ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | | | | Concentração no solo (mg. Kg^{-1}) | | | | |
| | | Dias amostrais | | | | | Dias amostrais | | | | |
| Tratamento | Princípio ativo | 0 | 1 | 7 | 15 | 30 | 0 | 1 | 7 | 15 | 30 |
| T1 | Trifloxistrobina | <LOQ | <LOQ | n.d | n.d | n.d | - | n.d | n.d | n.d | n.d |
| T1 | Tebuconazol | 74,7 | <LOQ | 9,5 | 2,5 | 0,8 | - | n.d | n.d | n.d | n.d |
| T2 | Triciclazol | 48,9 | 40,3 | 16 | 6,1 | 6 | - | n.d | n.d | n.d | n.d |
| T3 | Lambda-cialotrina | 261,2 | n.d | n.d | n.d | n.d | - | n.d | n.d | n.d | n.d |
| T3 | Tiametoxam | 31,7 | 12 | 6,6 | 1,5 | 0,2 | - | n.d | n.d | n.d | n.d |
| T4 | Diflubenzuron | 9,1 | 7,8 | 0,6 | n.d | n.d | - | 5,9 | n.d | n.d | n.d |

Tabela 3 - Densidade (organismos/m²) de macroinvertebrados bentônicos em cada tratamento, nos dois anos de estudo. T1 – trifloxistrobina + tebuconazol; T2 – triciclazole; T3 – lambda-cialotrina + tiametoxam; T4 – diflubenzuron; T5 – controle com plantas de arroz; T6 – controle sem plantas de arroz. CV: coeficiente de variação.

| Táxons | 2012/13 | | | | | | 2013/14 | | | | | |
|-------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Tratamentos | | | T4 | T5 | T6 | Tratamentos | | | T4 | T5 | T6 |
| T1 | T2 | T3 | T1 | | | | T2 | T3 | | | | |
| ARTHROPODA | | | | | | | | | | | | |
| INSECTA | | | | | | | | | | | | |
| Diptera | | | | | | | | | | | | |
| Chironomidae | 758 | 325.8 | 458 | 461.2 | 567.7 | 1506.4 | 15.3 | 53.8 | 46.1 | 23 | 25.6 | 69.2 |
| Ceratopogonidae | 35.4 | 54.8 | 141.9 | 41.9 | 145.1 | 1193.5 | 23 | 28.2 | 12.8 | 46.1 | 12.8 | 417.9 |
| Tipulidae | 3.2 | 3.2 | 9.6 | 6.4 | 6.4 | 25.8 | 2.5 | 7.6 | 2.5 | 5.1 | 7.6 | 0 |
| Odonata | | | | | | | | | | | | |
| Libellulidae | 3.2 | 0 | 3.2 | 3.2 | 0 | 80.6 | 0 | 2.5 | 0 | 0 | 0 | 15.3 |
| Coenagrionidae | 16.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6.4 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 0 | 2.5 | 17.9 |
| Coleoptera | | | | | | | | | | | | |
| Dryopidae | 19.3 | 12.9 | 12.9 | 25.8 | 12.9 | 6.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Noteridae | 0 | 3.2 | 0 | 6.4 | 3.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Curculionidae (larvas) | 6.4 | 3.2 | 6.4 | 0 | 9.6 | 80.6 | 30.7 | 43.5 | 61.5 | 56.4 | 35.9 | 225.6 |
| Curculionidae (adultos) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7.6 | 7.6 | 5.1 | 5.1 | 0 |
| Ditiscidae (larvas) | 3.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ditiscidae (adultos) | 0 | 0 | 0 | 6.4 | 6.4 | 16.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Gyrinidae | 6.4 | 9.6 | 0 | 3.2 | 6.4 | 32.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hidrophilidae | 0 | 0 | 0 | 3.2 | 0 | 19.3 | 2.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tricoptera | | | | | | | | | | | | |
| Hydroptilidae | 0 | 3.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.5 | 10.2 | 7.6 | 12.8 | 17.9 | 2.5 |
| Lepidoptera | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.2 | 0 | 0 | 0 | 2.5 | 0 | 0 | 0 |
| Hemiptera | | | | | | | | | | | | |
| Veliidae | 0 | 6.4 | 3.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.1 | 0 | 0 |
| Collembola | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 3.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CRUSTACEA | | | | | | | | | | | | |
| OSTRACODA | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 9.6 | 0 | 0 | 0 | 6.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ANNELIDA | | | | | | | | | | | | |
| OLIGOCHAETA | 45.1 | 80.6 | 138.7 | 83.8 | 119.3 | 135.4 | 94.8 | 87.1 | 51.2 | 100 | 28.2 | 523 |
| HIRUDINEA | 0 | 19.3 | 41.9 | 6.4 | 3.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NEMATODA | | | | | | | | | | | | |
| | 67.7 | 206.4 | 164.5 | 351.6 | 251.6 | 145.1 | 12.8 | 2.5 | 7.6 | 5.1 | 0 | 56.4 |
| MOLLUSCA | | | | | | | | | | | | |
| GASTROPODA | | | | | | | | | | | | |
| Mesogastropoda | | | | | | | | | | | | |
| Ampularidae | | | | | | | | | | | | |
| <i>Pomacea</i> sp. | 35.4 | 16.1 | 45.1 | 38.7 | 3.2 | 12.9 | 12.8 | 7.6 | 35.8 | 20.5 | 0 | 5.1 |
| Basommatophora | | | | | | | | | | | | |
| Planorbidae | | | | | | | | | | | | |
| <i>Biomphalaria</i> sp. | 29 | 103.2 | 96.7 | 277.4 | 83.8 | 9.6 | 0 | 0 | 12.8 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 1029 | 861.2 | 1122 | 1316 | 1222 | 3277 | 200 | 256.4 | 251.2 | 279.4 | 135.9 | 1333 |
| CV (%) | 9.3 | 16.6 | 24 | 8.9 | 11.1 | 28.7 | 24.1 | 14.1 | 16.5 | 25.2 | 12.8 | 11 |

Tabela 4 – Análise de variância de dois critérios para a densidade de macroinvertebrados bentônicos nas duas safras agrícolas. T1 – trifloxistrobina + tebuconazol; T2 – triciclazole; T3 – lambda-cialotrina + tiametoxam; T4 – diflubenzuron; T5 – controle com plantas de arroz; T6 – controle sem plantas de arroz.

| Tratamentos | Densidade (org/m ²) | |
|------------------|---------------------------------|----------|
| | 2012/13 | 2013/14 |
| T1 | 1.029 b* | 200 b |
| T2 | 861 b | 256 b |
| T3 | 1.122 b | 251 b |
| T4 | 1.316 ab | 279 b |
| T5 | 1.222 ab | 135 b |
| T6 | 3.277 a | 1.333 a |
| Total | 8.827 | 2.454 |
| F tratamento | 3.68 | 31.66 |
| p tratamento | 0.02 | < 0.0001 |
| F dias amostrais | 1 | 1.62 |
| p dias amostrais | 0.41 | 0.2073 |

* Letras minúsculas comparam os tratamentos entre si em cada ano agrícola. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 5 – Matriz de correlações para a densidade (org/m^2) de macroinvertebrados bentônicos, parâmetros físico-químicos e concentração dos agrotóxicos na água, na safra 2012/13. T1 – trifloxistrobina + tebuconazol; T2 – triciclazole; T3 – lambda-cialotrina + tiametoxam; T4 – diflubenzuron; T5 – controle com plantas de arroz; T6 – controle sem plantas de arroz. OD: oxigênio dissolvido; pH: potencial hidrogeniônico; T: temperatura; Tfx: trifloxistrobina; Tbc: tebuconazol; Tcc: triciclazol; λ : lambda-cialotrina; Tmx: tiametoxam; Dfb: diflubenzuron. Números em negrito representam $p \leq 0.05$.

| 2012/13 | Densidade T1 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | Tfx ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Tbc ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|------------------------------------|--------------|---------------------------|-------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| Densidade T1 | 1 | --- | --- | --- | --- | --- |
| OD (mg L^{-1}) | 0.98 | 1 | --- | --- | --- | --- |
| pH | -0.06 | 0.08 | 1 | --- | --- | --- |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 0.11 | 0.25 | 0.77 | 1 | --- | --- |
| Tfx ($\mu\text{g L}^{-1}$) | -0.03 | 0.11 | 0.85 | 0.98 | 1 | --- |
| Tbc ($\mu\text{g L}^{-1}$) | -0.12 | 0.02 | 0.82 | 0.97 | 0.99 | 1 |
| | Densidade T2 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | Tcc ($\mu\text{g L}^{-1}$) | |
| Densidade T2 | 1 | --- | --- | --- | --- | |
| OD (mg L^{-1}) | -0.31 | 1 | --- | --- | --- | |
| pH | -0.77 | 0.60 | 1 | --- | --- | |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | -0.10 | -0.36 | 0.38 | 1 | --- | |
| Tcc ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 0.01 | 0.10 | 0.53 | 0.84 | 1 | |
| | Densidade T3 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | λ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Tmx ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
| Densidade T3 | 1 | --- | --- | --- | --- | --- |
| OD (mg L^{-1}) | -0.82 | 1 | --- | --- | --- | --- |
| pH | 0.74 | -0.98 | 1 | --- | --- | --- |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 0.25 | -0.64 | 0.60 | 1 | --- | --- |
| λ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | -0.11 | -0.45 | 0.57 | 0.55 | 1 | --- |
| Tmx ($\mu\text{g L}^{-1}$) | -0.11 | -0.45 | 0.57 | 0.55 | 1 | 1 |
| | Densidade T4 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | Dfb ($\mu\text{g L}^{-1}$) | |
| Densidade T4 | 1 | --- | --- | --- | --- | |
| OD (mg L^{-1}) | -0.06 | 1 | --- | --- | --- | |
| pH | -0.58 | -0.50 | 1 | --- | --- | |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | -0.47 | -0.72 | 0.41 | 1 | --- | |
| Dfb ($\mu\text{g L}^{-1}$) | -0.77 | -0.44 | 0.96 | 0.55 | 1 | |
| | Densidade T5 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | | |
| Densidade T5 | 1 | --- | --- | --- | | |
| OD (mg L^{-1}) | -0.99 | 1 | --- | --- | | |
| pH | 0.32 | -0.30 | 1 | --- | | |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 0.89 | -0.84 | 0.55 | 1 | | |
| | Densidade T6 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | | |
| Densidade T6 | 1 | --- | --- | --- | | |
| OD (mg L^{-1}) | -0.60 | 1 | --- | --- | | |
| pH | 0.71 | -0.57 | 1 | --- | | |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 0.51 | -0.99 | 0.54 | 1 | | |

Tabela 6 – Matriz de correlações para a densidade (org/m^2) de macroinvertebrados bentônicos, parâmetros físico-químicos e concentração dos agrotóxicos na água, na safra 2013/14. T1 – trifloxistrobina + tebuconazol; T2 – triciclazole; T3 – lambda-cialotrina + tiametoxam; T4 – diflubenzuron; T5 – controle com plantas de arroz; T6 – controle sem plantas de arroz. OD: oxigênio dissolvido; pH: potencial hidrogeniônico; T: temperatura; Tbc: tebuconazol; Tcc: triciclazol; λ : lambda-cialotrina; Tmx: tiametoxam; Dfb: diflubenzuron. Números em negrito representam $p \leq 0.05$.

| 2013/14 | Densidade T1 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | Tbc ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | |
|------------------------------------|--------------|---------------------------|-------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------|--|
| Densidade T1 | 1 | --- | --- | --- | --- | | |
| OD (mg L^{-1}) | -0.01 | 1 | --- | --- | --- | | |
| pH | 0.47 | -0.72 | 1 | --- | --- | | |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 0.06 | -0.89 | 0.87 | 1 | --- | | |
| Tbc ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 0.43 | 0.46 | -0.51 | -0.66 | 1 | | |
| | Densidade T2 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | Tcc ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | |
| Densidade T2 | 1 | --- | --- | --- | --- | | |
| OD (mg L^{-1}) | -0.43 | 1 | --- | --- | --- | | |
| pH | -0.19 | 0.73 | 1 | --- | --- | | |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 0.45 | -0.97 | -0.65 | 1 | --- | | |
| Tcc ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 0.24 | 0.48 | 0.52 | -0.59 | 1 | | |
| | Densidade T3 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | λ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Tmx ($\mu\text{g L}^{-1}$) | |
| Densidade T3 | 1 | --- | --- | --- | --- | --- | |
| OD (mg L^{-1}) | -0.33 | 1 | --- | --- | --- | --- | |
| pH | 0.45 | -0.76 | 1 | --- | --- | --- | |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 0.39 | -0.96 | 0.89 | 1 | --- | --- | |
| λ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 0.10 | 0.46 | -0.64 | -0.60 | 1 | --- | |
| Tmx ($\mu\text{g L}^{-1}$) | -0.14 | 0.54 | -0.85 | -0.72 | 0.93 | 1 | |
| | Densidade T4 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | Dfb ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | |
| Densidade T4 | 1 | --- | --- | --- | --- | | |
| OD (mg L^{-1}) | 0.25 | 1 | --- | --- | --- | | |
| pH | 0.21 | 0.64 | 1 | --- | --- | | |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | -0.46 | -0.94 | -0.57 | 1 | --- | | |
| Dfb ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 0.63 | 0.15 | -0.06 | -0.47 | 1 | | |
| | Densidade T5 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | | | |
| Densidade T5 | 1 | --- | --- | --- | | | |
| OD (mg L^{-1}) | 0.37 | 1 | --- | --- | | | |
| pH | -0.33 | -0.69 | 1 | --- | | | |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | -0.28 | -0.80 | 0.97 | 1 | | | |
| | Densidade T6 | OD (mg L^{-1}) | pH | T ($^{\circ}\text{C}$) | | | |
| Densidade T6 | 1 | --- | --- | --- | | | |
| OD (mg L^{-1}) | 0.81 | 1 | --- | --- | | | |
| pH | -0.22 | 0.07 | 1 | --- | | | |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | -0.48 | -0.78 | -0.37 | 1 | | | |

2.3 ARTIGO 3

Cytogenotoxicity of rice crop water after application of the tricyclazole fungicide

ALANA CRISTINA DORNELES WANDSCHEER¹, ENIO MARCHESAN¹, SOLANGE BOSIO TEDESCO², VIVIANE DAL-SOUTO FRESCURA², CAMILLE FLORES SOARES¹, GUILHERME PILAR LONDERO¹, GUSTAVO MACK TELÓ¹, DÂMARIS SULZBACH SANTOS HANSEL¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Fitotecnia, Grupo de Pesquisa em Arroz Irrigado e Uso Alternativo de Várzeas. Avenida Roraima, 1000, Prédio 85, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

² Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade. Avenida Roraima, 1000, Prédio 16, Sala 3111. Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

Keywords: bioindicator, chromosomal abnormalities, mitotic index, pesticide, irrigated rice.

Running title: Cytogenotoxicity of tricyclazole fungicide.

Field of research of the present study: Agrarian Sciences.

Corresponding author: Enio Marchesan (Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Departamento de Fitotecnia, Prédio 44, sala 5335, Camobi, Santa Maria - RS, 97105-900). E-mail: eniomarchesan@gmail.com

ABSTRACT

Tricyclazole is currently one of the fungicides recommended for the treatment of diseases in irrigated rice. However, there is relatively little information on its cytotoxic and genotoxic potential. The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of rice crop water after application of the tricyclazole fungicide through the *Allium cepa* L. test. The rice crop water samplings were collected before and 1, 15 and 30 days after application of the fungicide in rice plant shoots. The *Allium cepa* roots were placed in contact with the rice crop water to check for possible chromosomal abnormalities and mitotic index of the bioindicators meristematic cells. The data obtained by the *Allium cepa* test indicates that the application of the tricyclazole fungicide leads to an increase in the genotoxic activity in the rice crop water, through the appearance of chromosomal abnormalities, without, however, causing significant effects on the mitotic index. The major chromosomal alterations observed were anaphasic and telophasic bridges and laggard chromosomes.

Keywords: bioindicator, chromosomal abnormalities, mitotic index, pesticide, irrigated rice.

INTRODUCTION

The chemical properties and concentration of pesticides applied to the environment are important factors to consider as to the harm that can be caused to the biota exposed to them. Studies have shown that some pesticides can be toxic and/or genotoxic to different organisms and influence survival, fertility and genetic composition of the populations. In this sense, knowledge about the toxicity and genotoxicity of pesticides used in Brazilian agriculture is extremely important (Krüger 2009).

One of the options to monitor the genotoxic effect of pesticides is to use plants as target organisms, since the plants are recognized as excellent genetic models on the detection of environmental mutagenic agents and, therefore, they are frequently used for biomonitoring studies. The *Allium cepa* L. test is used as a system for evaluation of the mutagenicity of substances; it is a low cost and easy-to-apply test; besides, it has benefits over other tests that need previous preparation of tested samples and the addition of an exogenous metabolic system (Leme and Marin-Morales 2009). Radic et al. (2010) highlight that the use of plant bioassays provides numerous advantages of comparison with animal systems, because of the similarity of chromosomal morphology and the similar responses to mutagenesis. Furthermore, plant systems are less expensive and can be conducted in less time.

The *A. cepa* test consists of a method of chromosomal alterations in onion roots; it is very effective in analyzing and monitoring the genotoxicity of environmental substances *in situ*. It is a method validated by the Sistema Internacional de Segurança Química and by the United Nations Environment Programme (UNEP) (Bagatini et al. 2007).

Tedesco and Laughinghouse IV (2012) highlighted that mutagens can be detected cytologically by cell division inhibition, chromosomal breakage in metaphase, induction of structural and numerical alterations, varying from chromosomal fragmentation to disruption of mitotic spindle. Thus, studies that enable the evaluation of genotoxicity of components present in the environment, whether industrial waste, pesticides, residues or even vegetal infusions, is extremely important and can easily be analyzed by the *A. cepa* test.

The tricyclazole is a systemic fungicide from the benzothiazole chemical group that is recommended for the control of the fungus *Pyricularia grisea*, popularly known as rice blast, which is one of the most important diseases of rice crop. The tricyclazole fungicide is preventive and should be applied to rice crops before the panicles, spikelets and tillers are exposed to infection. The pesticide can be applied by air or backpack sprayers. Two fungicide applications are usually performed, and the second application should be made at 15 or 20 days after the first application (SOSBAI 2012; MAPA 2015). However, there is still little information about its cytogenotoxic potential in the environment. The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of rice crop water after application of the tricyclazole fungicide through the *A. cepa* test.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in an experimental floodplain rice area of the Plant Science Department, Federal University of Santa Maria, during the 2012/13 season. The rice crop was sown in experimental plots with a total area of 10m² each (4 m long and 2.5 m wide), isolated by levees (barrier composed by soil against water mixture) with individual irrigation and drainage. Each experimental plot was composed of one treatment in the field. In the first experimental plot, there was a single application of fungicide containing the active ingredient tricyclazole at the dose of 300 grams of the pesticide per hectare (225 grams of the active ingredient per hectare) on the rice shoots, when the crop was at the R2 reproductive stage (collar formation on flag leaf), according to the scale of Counce et al. (2000); in the second experimental plot, no pesticides were applied during the entire cultivation. The application of pesticide was done with a CO₂ pressurized backpack sprayer using 150 L ha⁻¹ of spraying

volume attached to a spray boom with five hollow cone nozzles (Jacto JA-2) spaced 0.50 m and operating at 276 kPa.

The cultivar used was PUITA INTA CL, seeded at a density of 85 kg ha⁻¹ seed, in the minimum tillage system. Fertilization, side dressing nitrogen fertilization, the beginning of irrigation and other cultural practices were conducted according to soil analysis and technical recommendations for irrigated rice (SOSBAI 2012).

The experiments with the *Allium cepa* test were carried out in the Laboratory of Plant Cytogenetics and Genotoxicity, Federal University of Santa Maria. For this purpose, water from experimental plots was collected at four times: 24 hours before fungicide application (0 day), 1 day, 15 days and 30 days after fungicide application. The cytogenotoxicity of the rice crop water was tested in each sampling through the *A. cepa* test by assessing changes in the mitotic index and chromosomal structure.

For each water sampling day, four treatments were evaluated: T1: distilled water (negative control); T2: glyphosate at 3% (positive control); T3: rice crop water (water from experimental plots where no pesticides were applied); T4: rice crop water + tricyclazole (water from experimental plot with application of tricyclazole).

The experimental design was completely randomized with three replications (onion bulbs) per treatment. The bulbs were placed in distilled water for a period of 72 hours at room temperature and afterwards they were transferred to test-solutions for a period of 24 hours.

After the period of root exposure to the *A. cepa* treatments, the bulbs were removed from the test-solutions and the roots were collected and fixed in 3:1 (ethanol: acetic acid) for a 24-hour period at room temperature and stored in 70% ethanol under refrigeration. For the preparation of slides, the roots were removed from the 70% ethanol, rinsed in distilled water and only the 5 mm rootlets were separated for the slides; they were hydrolyzed with 1N HCl for 5 minutes, rinsed again in distilled water and stained with 2% orcein-acetic, using the crushing technique (Guerra and Souza 2002).

Two slides were prepared for each bulb. The slides were observed under a microscope and analyzed. The total number of cells in interphase and mitotic was counted and the mitotic index (MI) was calculated through the formula: (number of cells in prophase + number of cells in metaphase + number of cells in anaphase + number of cells in telophase) / total number of cells observed (Sehgal et al. 2006). A total of 3000 cells were counted per treatment, and 1000 cells per bulb were analyzed.

The mitotic index data was subjected to pairwise comparisons using Tukey's Test and an overall risk level of 5%. The chromosomal alterations were expressed as percentages of the total cells in cell division.

RESULTS AND DISCUSSION

The cytotoxicity and genotoxicity of rice crop water before and after application of tricyclazole was analyzed using the *A. cepa* test. Considering that the mitotic index is used as a biological indicator of appropriate cell proliferation (Gadano et al. 2002), which can be measured through the *A. cepa* test (Tedesco and Laughinghouse IV 2012), it can be inferred that the application of tricyclazole did not cause significant changes in the mitotic index of *A. cepa* L., since the mitotic index values were similar to those of the laboratory control (distilled water) or the field control (rice crop water) for all sampling days (Table 1).

We observed that on the 1st day (1 day after tricyclazole application), the mitotic index of rice crop water + tricyclazole (T4) was 4.7% and did not differ from rice crop water (T3) and distilled water (T1) with MI = 5.43% and 5%, respectively. Similar behavior was observed for the 15th day and the 30th day after fungicide application, where the treatment T4 presented a similar mitotic index to that of rice crop water (MI = 3.87% and 3.4%, respectively) and similar to that of distilled water (MI = 3.3% and 3.77%, respectively).

As far as chromosomal abnormalities are concerned, it was found that the rice crop water without fungicide application showed antiproliferative properties which can be observed on the 15th day and the 30th day (Table 1). This phenomenon may be associated with the complex environment of rice crops, since rice irrigation water usually comes from water reservoirs, which may contain residues of compounds that have been leached from other places and reached the crops through a water stream, or products from organic decomposition that can exhibit cytotoxic and genotoxic action on sensitive bioindicator organisms such as *A. cepa*.

Currently, there is great concern about the final destination of rice crop water due to the contamination of lakes, rivers and groundwater, since rice crop is preferably cultivated close to water sources. Besides, an irrigated rice crop is an important habitat for a variety of animals, especially invertebrates, which develop part of their aquatic life cycle in the wet environment of rice crops (Bambaradeniya et al. 2004). These organisms can be exposed to agents capable of inducing chromosomal abnormalities, which may result in the development of cancer or cell death processes (Bagatini et al. 2009, Costa and Menk 2000) or harm the

vital process of cells such as genetic material duplication and genetic transcription (Costa and Menk 2000).

Fisun and Rasgele (2009) stressed that the decrease in mitotic index can be used as assessment of cytotoxicity. However, mutagenic effects result in chromosomal abnormalities that can be detected during the cell cycle through cytogenetic analysis. The genotoxicity reviews mainly include DNA damage, mutations and chromosomal alterations (Tedesco and Laughinghouse IV 2012). Thus, the structural and/or numerical analysis of chromosomal alterations can significantly contribute the interpretation of the effects of chemical compounds to the environment.

In this study, there were genotoxic effects in rice crop water before fungicide application; however, with a lower percentage compared to the values obtained after applying tricyclazole. There was an increase in the percentage of chromosomal abnormalities present in rice crop water after applying tricyclazole, which was detected by the *A. cepa* test up to 30 days after application (Table 2).

The observed chromosomal alteration values ranged from 19.83% to 22.22% in the treatment containing rice crop water + tricyclazole, and when these values are compared with those observed for rice crop water without fungicide application, the values ranged from 11.04% to 16.67%, showing the effect of the fungicide on the cell cycle of *A. cepa*. The observed changes, such as telophasic and anaphasic bridges, appeared in greater numbers after applying the fungicide on all sampling days (1st, 15th and 30th days), which consequently led to the appearance of micronuclei observed after the arrival of the chromosomes at the cell poles (Table 2).

The onions exposed to negative control at the laboratory (T1) showed low percentage of chromosomal abnormalities, ranging from 0.93% to 4.1% (Table 2). Although *A. cepa* chromosomal abnormalities in cells exposed to distilled water is not a frequent event, this result may be found in some tests. Similar results were observed by Machado et al. (2012), where 4% of chromosomal abnormalities were found in *A. cepa* root cells after exposure to the negative control treatment with distilled water, compared to 27% of chromosomal alterations found in diluted wastewater treatment. Likewise, Ping et al. (2012) found 0.17% of chromosomal abnormalities in cells exposed to *A. cepa* roots treated with distilled water.

Among the chromosomal abnormalities observed in the *A. cepa* test, we found anaphasic and telophasic bridges, laggard chromosomes, micronuclei and binucleate cells (Figure 1). In the rice crop water + tricyclazole treatment, we observed a greater number of anaphasic and telophasic bridges and laggard chromosomes compared to other alterations.

During mitosis, the chromosomes in metaphase are arranged in the central region of the cell, where sister chromatids can migrate to opposite poles of the cell because of the centromeres, resulting in cytokinesis, which divides the original cell into two more genetically identical cells (Bagatini et al. 2009). The alterations observed in this study may be explained by the fact that chromosomal breakage is one the major cytogenetic alterations in metaphasic cells. When the cell is in anaphase and there is a genotoxic effect, the disorganization of the mitotic spindle may occur, causing anaphasic bridges or micronuclei formation in telophase cells (Fiskesjö 1993, El-Shahaby et al 2003).

The tricyclazole (benzothiazole C₉H₇N₃S, log Kow 1.42) is a systemic fungicide with limited information about transport and fate in rice fields (Phong et al. 2009). One of the few studies was performed by Padovani et al. (2006), who detected tricyclazole residues in water samples after rice harvest, and also noted that variables such as season and year are important factors in determining the distribution of tricyclazole residues. The authors highlighted that there is high persistence of tricyclazole in the water - soil system, with a half-life of 4 to 17 months under laboratory conditions and 6 months under field conditions, as it is not easily hydrolyzed in the environment. However, Phong et al. (2009) detected only about 2% of tricyclazole in rice crop water one day after application. The authors stressed that although the photodegradation of tricyclazole is lower compared to other compounds, it can interfere in the degradation of the product in the environment. Also, different soil properties, besides the organic material, may result in higher or lower degradation of the product.

Studies were developed under laboratory conditions to verify the physiological and toxicological effects of tricyclazole on animal species, especially invertebrates (Sancho et al. 2009; Rossaro and Cortesi 2013). However, assessments of the cytogenotoxicity of rice crop water after application of tricyclazole are scarce; moreover, there are relatively few works in real field conditions, because it is very difficult to understand interactions that exist between chemical and physical factors, and biological agents that act on the ecosystem. In the present study, the data obtained by the *Allium cepa* test (in vivo model plant) indicates that the application of tricyclazole fungicide results in an increase of the genotoxic activity in rice crop water through the appearance of chromosomal alterations, without significant effects on the mitotic index. However, the understanding of the interactions among the various factors involved can support decisions about sustainable management, thus avoiding the use of compounds with cytogenotoxic action and prioritizing substances with less environmental impact.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel & National Council for Scientific and Technological Development for financial support (Projeto Universal No 14/2012).

RESUMO

O triciclazol é atualmente um dos fungicidas recomendados para o tratamento de doenças na cultura do arroz irrigado. No entanto, há relativamente poucas informações sobre o seu potencial citotóxico e genotóxico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade da água de irrigação da cultura do arroz após aplicação do fungicida triciclazol por meio do teste de *Allium cepa* L. Amostras de água da lavoura de arroz irrigado foram coletadas antes e 1, 15 e 30 dias após a aplicação do fungicida sob a parte aérea das plantas de arroz. Raízes de *A. cepa* foram colocadas em contato com a água da lavoura para se verificar possíveis alterações cromossômicas e no índice mitótico das células meristemáticas do bioindicador. Os dados obtidos pelo teste de *Allium cepa* indicam que a aplicação do fungicida triciclazol leva ao aumento da atividade genotóxica na água de irrigação da lavoura de arroz, através do aparecimento de alterações cromossômicas, sem, contudo, causar efeitos significativos sobre o índice mitótico. As principais alterações cromossômicas observadas foram pontes anafásicas e telofásicas e cromossomos perdidos.

Palavras-chave: bioindicador, alterações cromossômicas, índice mitótico, agrotóxico, arroz irrigado.

REFERENCES

BAGATINI MD, SILVA ACF da AND TEDESCO SB. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn 17: 444-447.

BAGATINI MD, VASCONCELOS TG, LAUGHINGHOUSE IV HD, MARTINS AF AND TEDESCO SB. 2009. Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* L. test. Bull Environ Contam Toxicol 82: 590–592.

BAMBARADENIYA CNB, EDIRISINGHE JP, SILVA DN de, GUNATILLEKE CVS, RANAWANA KB AND WIJEKOON S. 2004. Biodiversity associated with an irrigated rice agro-ecosystem in Sri Lanka. *Biodiversity Conserv* 13: 1715-1753.

COSTA RMA AND MENK CFM. 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* 2: 24–26.

COUNCE PA, KEISLING TC AND MITCHELL AJ. 2000. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. *Crop Sci* 40: 436-443.

EL-SHAHABY AO, ABDEL MIGID HM, SOLIMAN MI AND MASHALY IA. 2003. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pak J Biol Sci* 6: 23–28.

FISKESJÖ G. 1993. The *Allium* test in wastewater monitoring. *Environ Toxic Water* 8: 291–298.

FISUN K AND RASGELE PG. 2009. Genotoxic Effects of Raxil on Root Tips and Anthers of *Allium cepa* L. *Caryologia* 62: 1-9.

GADANO A, GURNI A, LÓPEZ P, FERRARO G AND CARBALLO M. 2002. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *J Ethnopharmacol* 81: 11-16.

GUERRA M AND SOUZA MJ. 2002. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 191p.

KRÜGER RA. 2009. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*. 58f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Centro Universitário Feevale.

LEME DM AND MARIN-MORALES MA. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res* 682: 71–81.

MACHADO EL, DAMBROS V, KIST LT, ACAYAGA EAL, TEDESCO SB AND MORO CC. 2012. Use of Ozonization for the Treatment of Dye Wastewaters containing Rhodamine B in the Agate Industry. *Water, Air Pollut* 223: 1753-1764.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA, MAPA. Agrofit. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>>. Acesso em: 20 abril. 2015.

PADOVANI L, CAPRI E, PADOVANI C, PUGLISI E AND TREVISAN M. 2006. Monitoring tricyclazole residues in rice paddy watersheds. *Chemosphere* 62: 303-314.

PHONG TK, NHUNG DTT, MOTOBAYAH T, THUYET DQ AND WATANABE H. 2009. Fate and transport of nursery-box-applied tricyclazole and imidacloprid in paddy fields. *Water, Air Pollut* 202: 3-12.

PING KY, DARAH I, YUSUF UK, YENG C AND SASIDHARAN S. 2012. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. *Molecules* 17: 7782-7791.

RADIĆ S, STIPANIČEV D, VUJČIĆ V, RAJČIĆ MM, ŠIRAC S AND PEVALEK-KOZLINA B. 2010. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Sci Total Environ* 408: 1228–1233.

ROSSARO B AND CORTESI P. 2013. The effects of tricyclazole treatment on aquatic macroinvertebrates in the field and in laboratory. *Journal of Entomological and Acarological Research* 45: 128-136.

SANCHO E, FERNÁNDEZ-VEGA C, VILLARROEL MJ, ANDREU-MOLINER E AND FERRANDO MD. 2009. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. *Comp Biochem Physiol C* 150: 25–32.

SEHGAL R, ROY S AND KUMAR DVL. 2006. Evaluation of cytotoxic potential of latex of *Calotropis procera* and Podophyllotoxin in *Allium cepa* root model. *Biocell* 30: 9-13.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO, SOSBAI. 2012. Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado, 29., Gravatal, 176p.

TEDESCO SB AND LAUGHINGHOUSE IV HD. 2012. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. Environmental Contamination, Dr. Jatin Srivastava (Ed.), ISBN: 978-953-51-0120-8, InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicitythe-allium-cepa-test>>.

Table 1 – Number of *Allium cepa* cells at the interphase and mitosis stages. Santa Maria, 2014

| Day | Treatment | Interphase | Prophase | Metaphase | Anaphase | Telophase | MI (%) |
|--------|-----------|------------|----------|-----------|----------|-----------|--------|
| 0 | T1 | 2854 | 46 | 46 | 28 | 26 | 4,87 b |
| | T2 | 2916 | 35 | 33 | 10 | 6 | 2,8 c |
| | T3 | 2821 | 86 | 49 | 26 | 18 | 5,97 a |
| | T4 | - | - | - | - | - | - |
| CV (%) | | | | | | | 7,74 |
| 1 | T1 | 2850 | 66 | 34 | 12 | 38 | 5 a |
| | T2 | 2937 | 30 | 14 | 8 | 11 | 2,1 b |
| | T3 | 2837 | 64 | 61 | 22 | 16 | 5,43 a |
| | T4 | 2859 | 66 | 26 | 22 | 27 | 4,7 a |
| CV (%) | | | | | | | 16,02 |
| 15 | T1 | 2786 | 116 | 46 | 24 | 28 | 7,13 a |
| | T2 | 2988 | 7 | 2 | 0 | 3 | 0,4 c |
| | T3 | 2898 | 36 | 27 | 19 | 20 | 3,4 b |
| | T4 | 2884 | 51 | 35 | 17 | 13 | 3,87 b |
| CV (%) | | | | | | | 9,11 |
| 30 | T1 | 2887 | 38 | 28 | 25 | 22 | 3,77 a |
| | T2 | 2971 | 13 | 7 | 3 | 6 | 0,97 c |
| | T3 | 2930 | 27 | 24 | 11 | 8 | 2,33 b |
| | T4 | 2901 | 49 | 24 | 13 | 13 | 3,3 a |
| CV (%) | | | | | | | 12,35 |

(0): 24 hours before application of fungicide; (1): 24 hours after application of fungicide; (15): 15 days after application of fungicide; (30): 30 days after application of fungicide; (T1): distilled water; (T2): glyphosate at 3%; (T3): rice crop water; (T4): rice crop water + tricyclazole; (MI): mitotic index; (CV): coefficient of variation. The same letters in the column do not differ by Tukey test at 5% error probability.

Table 2 – Number of *Allium cepa* cells in cell division and chromosomal abnormalities. Santa Maria, 2014

| Day | Treatment | CD | ATB | LC | MC | BC | CA (n) | CA (%) |
|-----|-----------|-----|-----|----|----|----|--------|--------|
| 0 | T1 | 146 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 | 4,1 |
| | T2 | 84 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4,76 |
| | T3 | 179 | 5 | 3 | 0 | 0 | 8 | 4,47 |
| | T4 | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 | T1 | 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | T2 | 63 | 9 | 4 | 5 | 3 | 21 | 33,33 |
| | T3 | 163 | 4 | 11 | 1 | 2 | 18 | 11,04 |
| | T4 | 141 | 11 | 7 | 8 | 2 | 28 | 19,86 |
| 15 | T1 | 214 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0,93 |
| | T2 | 12 | 0 | 1 | 0 | 7 | 8 | 66,67 |
| | T3 | 102 | 4 | 8 | 2 | 3 | 17 | 16,67 |
| | T4 | 116 | 6 | 11 | 2 | 4 | 23 | 19,83 |
| 30 | T1 | 113 | 1 | 3 | 0 | 0 | 4 | 3,54 |
| | T2 | 29 | 3 | 6 | 2 | 7 | 18 | 62 |
| | T3 | 70 | 2 | 5 | 1 | 1 | 9 | 12,86 |
| | T4 | 99 | 3 | 8 | 5 | 6 | 22 | 22,22 |

(0): 24 hours before application of fungicide; (1): 24 hours after application of fungicide; (15): 15 days after application of fungicide; (30): 30 days after application of fungicide; (T1): distilled water; (T2): glyphosate at 3%; (T3): rice crop water; (T4): rice crop water + tricyclazole; CD: Number of cells showing regular division; ATB: anaphasic and telophasic bridges; LC: laggard chromosomal; MC: micronuclei cell; BC: binucleate cell; CA (n): number of chromosomal abnormalities; CA (%): % of chromosomal abnormalities in relation to the number of dividing cells.

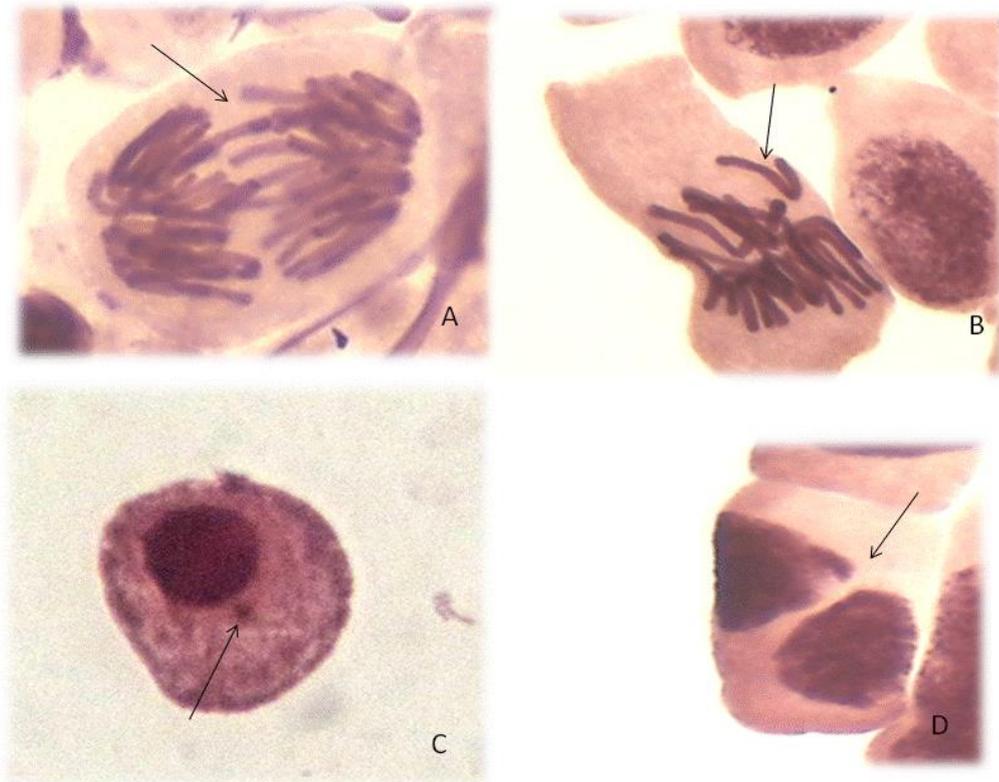


Figure 1 – Chromosomal abnormalities observed in *Allium cepa* cells after application of tricyclazole. (A): anaphasic bridges (B): laggard chromosomal (C): micronuclei cell (D): binucleate cell. Santa Maria, 2014.

2.4 ARTIGO 4

Mixture effects of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin on *Chironomus dilutus*

Alana C.D. Wandscheer^{1,2}, Enio Marchesan², Kara Minton¹, Jonathan D. Maul¹

Affiliations:

¹ Department of Environmental Toxicology, The Institute of Environmental and Human Health, Texas Tech University, Lubbock, Texas 79409 USA

² Graduate Program in Agronomy, Universidade Federal de Santa Maria/Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

Abstract

The objective of this study was to analyze the mixture effects of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin on *Chironomus dilutus*. Toxicity tests were used to assess the effects of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin, alone and in combination, on survival and growth of the benthic invertebrate, *C. dilutus*. Standard 10 d sediment toxicity tests were conducted using third instar organisms. Preliminary tests exposing organisms to thiamethoxam were performed to obtain the LC50 for *C. dilutus*. Organisms were exposed to thiamethoxam concentrations of 4.38, 8.75, 17.5, 35.0, 70.0, 140 µg/L. For the co-exposure experiment with thiamethoxam and lambda-cyhalothrin fifteen treatments were utilized. The concentrations of thiamethoxam were 5.7, 8.2 and 9.8µg/L and 0.0090, 0.013 and 0.019µg/L for lambda-cyhalothrin, alone and in combination. The preliminary experiment with thiamethoxam showed an LC50 of 15.6 µg/L (13.7-18.1 µg/L) for *C. dilutus*. There was no significant difference on body length, head capsule width and dry mass of the organisms after exposure individual to thiamethoxam and lambda-cyhalothrin and in co-exposure.

Keywords: Insecticide; Lambda-cyhalothrin; Neonicotinoid, Pyrethroid, Thiamethoxam

Introduction

Irrigated rice farming has great economic relevance to Brazil since it is the ninth largest producer of rice in the world [1]. Rio Grande do Sul is the state that ranks first in rice grain production in the country, accounting for over 61% of total production in Brazil. The use of pesticides aims to protect rice crop from pests and diseases. The rice plants can be attacked by different groups of insects. Currently, insect control is achieved by chemical insecticides [1]. Yet, some pesticides can be combined in a single mixture for the most effective control of pests [2]. Pyrethroids and neonicotinoids such as lambda-cyhalothrin and thiamethoxam are widely used to control pests such as *Oeballus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), the small rice stink bug [3]. This insect sucks the branches and spikelets in rice panicles, resulting in reductions in mass, germination and commercial standard. The nature and extent of the damage depends on the stage of development of the spikelets and the infestation density [4].

Pyrethroid insecticides are derived from natural pyrethrins taken from the pyrethrum of dried *Chrysanthemum* flowers. They include a variety of insecticides with different chemical modifications, making them highly toxic and less degradable in the environment. These reasons may cause concern about their potential as a pollutant and their effects on both humans and non-target organisms [5]. The mode of action of the pyrethroids is through of the voltage-dependent sodium channel in the nerve membrane in insects. These compounds act primarily on the neuromuscular system of insects and when an insect is intoxicated with pyrethroids, it quickly develops hyperexcitation followed by paralysis [6,7]. Lambda-cyhalothrin is a pyrethroid insecticide widely used in Brazil to control *Oryzophagus oryza* (Costa Lima) (Coleoptera: Curculionidae), the most damaging insect in irrigated rice in the south region of Brazil, and *Tibraca limbativentris* (Stal) (Hemiptera: Pentatomidae) (rice stem bug) [1]. Because it is a lipophilic compound, lambda-cyhalothrin can bind to the organic

matter in soil easily [8]. Also, lambda-cyhalothrin may cause toxicity to aquatic organisms that feed on contaminated sediments and organic matter [9] or simply are exposed to toxicants in the water column [10]. In aquatic ecosystems lambda-cyhalothrin may be degraded by photochemical processes [11]. The persistence depends on environmental factors such as temperature and characteristics of the soil, which can modify the half-life of the insecticide. In tropical regions, pesticide characteristics, the rate and climate and frequency of application, pH, organic matter content and composition of soil organisms also contribute to differences in the effects on invertebrates [12]. Lambda-cyhalothrin was shown to be a potential risk of insecticide to populations of macroinvertebrates present in headwater streams [13].

Neonicotinoids are broad spectrum systemic insecticides and are widely used in many countries [14], however, their widespread use has an increasing impact on non-target organisms and the environment, including surface water [15]. They have numerous uses in agriculture and are highly toxic to most arthropods. Their toxicity occurs via action on the acetylcholine nicotinic receptors of insects, causing nerve stimulation at low concentrations or paralysis and even death on higher concentrations. They are water soluble and readily absorbed by plants. Neonicotinoid contamination of nearby bodies of water may also occur due to leaching by rain water. Recent studies indicate that neonicotinoids may persist and accumulate in soils and can negatively impact a range of soil aquatic invertebrates [16]. Temporary wetlands as irrigated rice farming fields are among the sites with highest risk of contamination by neonicotinoids [17].

Thiamethoxam is a neonicotinoid insecticide that was introduced in Brazil in 1999 [18]. It has high water solubility and low sorption in soil [19]. Persistence in soils may occur and factors such as application rate, temperature, pH, crop rotation, soil type and organic content, among others, can influence the degree of contamination by thiamethoxam [14].

Although negative effects of the neonicotinoids on non-target soil arthropods are well known [20], studies on toxic effects of lambda cyhalothrin and thiamethoxam mixtures on non-target aquatic organisms have not been examined. This combination has been widely used, especially in rice paddy fields in southern Brazil. More studies are needed to investigate the impact of the use of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin and the possible risks to aquatic fauna inhabiting fields in rice farming.

It is common practice in Brazilian agriculture to use these two chemicals for pest control in irrigated rice farming. The objective of this research was to verify the effects of lambda-cyhalothrin and thiamethoxam, alone and in combination, on the non-target aquatic insect, *C. dilutus* using 10 d sediment toxicity tests.

Materials and methods

C. dilutus toxicity tests

Toxicity tests were used to assess the effects of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin, alone and in combination, on survival and growth of the benthic invertebrate, *C. dilutus*. Standard 10-d sediment toxicity tests were conducted [21] using third instar organisms (head capsule width = 0.39 ± 0.04 mm) obtained from laboratory cultures. An additional group of *C. dilutus* larvae ($n=40$) were preserved at the beginning of the experiment to evaluate the body length, head capsule width and dry mass (initial group) [21].

In Experiment 1, preliminary tests with thiamethoxam were performed to find the LC50 for *C. dilutus*. The organisms were exposed to thiamethoxam concentrations of 0.0, 4.38, 8.75, 17.5, 35.0, 70.0, and 140 µg/L. The thiamethoxam stock solution was prepared and diluted in an acetone carrier and the test solutions were prepared in moderately hard water. Each treatment consisted of six replicates and five organisms per replicate. Survival of the organisms was evaluated at 2, 4, 6, 8, 10 d. The experimental units of both experiments

(Experiment 1 - LC50 thiamethoxam; Experiment 2 – toxicity of lambda-cyhalothrin and thiamethoxam, alone and combination) consisted of 400 mL beakers with 300 mL of solution and about 20 mL of clean sand. The jars were kept for 10 d in a 16:8h light:dark photoperiod, at a temperature of $24\pm 1^\circ$ C. The water quality parameters (dissolved oxygen, conductivity, and pH) were recorded at the beginning and the end of the experiment, through an Accumet® XL 60 dual channel meter and an Orion 3-Star™ benchtop conductivity meter. Every day, 750 mL of 4g/L Tetrafin™ solution (Tetra Holding, Inc., Blackburg, VA, USA) was added to each experimental unit. The water levels in each experimental unit was marked at the beginning of the experiment and deionized (DI) water was added as needed to compensate for evaporation [22].

For Experiment 2, treatments consisted of 15 combinations of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin, alone and in combination (Table 1). The concentrations of thiamethoxam were 5.7, 8.2 and 9.8 μ g/L and 0.0090, 0.013 and 0.019 μ g/L for lambda-cyhalothrin. Concentrations were chosen based on previous research and preliminary tests conducted in the laboratory. For the mixture experiment, six replicates and four organisms were used in each jar.

After 10 d of exposure organisms were removed from experimental units by passing water and sand through a 500 μ m sieve. The number of organisms alive was recorded and preserved in 70% ethanol for growth measurements. To analyze the growth of the organisms, digital pictures were taken using a Leica MZ9.5 stereomicroscope (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA) and body length and head capsule width were obtained by using ImageJ software (Ver 1.41o; National Institutes of Health, USA).

Organisms were dried at 60°C for 3 d and after that, dry mass was obtained using a microbalance (Cahn C-33). The organisms preserved in the beginning of the experiment were photographed using a Leica MZ9.5 stereomicroscope (Leica Microsystems, Bannockburn, IL,

USA) and the body length and head capsule width were measured using ImageJ software. Dry mass was determined using a microbalance. To measure dry mass, the initial organisms were pooled due to their low masses.

Statistical Analysis

For the thiamethoxam preliminary experiment, the LC50 was estimated for each treatment with logistic regressions through a generalized linear model with a logit link function, binomial probability distribution, and a maximum likelihood estimation method (JMP version 9.0.0).

The effects of lambda-cyhalothrin and thiamethoxam, and their interaction on *C. dilutus* for body length, head capsule width and dry mass were tested using two-way ANOVAs in JMP Statistical Analysis Software (Version 9.0.0).

Results

The preliminary experiment with thiamethoxam (Experiment 1) showed an LC50 of 15.6 µg/L (13.7-18.1) for *C. dilutus* (Figure 1).

The values of conductivity, pH and dissolved oxygen for the water from the experimental units of experiment 2 are shown in Table 2. It was observed that the conductivity ranged from 287.4 to 292.2 µS/cm, the pH ranged from 7.85 to 8.15 and the dissolved oxygen ranged from 7.03 to 5.8 mg/L on day 0 (experimental setup) and on day 10 (last day of the experiment), the water conductivity values ranged from 387 to 483 µS/cm, the pH ranged from 7.71 to 8.9 and the dissolved oxygen varied from 6.19 to 7.47 mg/L.

In Experiment 2, comparing thiamethoxam and lambda-cyhalothrin alone and in combination showed that the tested doses did not significantly affect the survival of organisms (Figure 2a) compared to control.

After 10 days of exposure to thiamethoxam and lambda-cyhalothrin, organisms had a significantly longer body length (Figure 2b) and wider head capsule width (Figure 2c) than the initial group of organisms. However, there was no significant difference in treatments when compared to the control, showing that the effects of each chemical alone and in combination did not have a significant effect on body length and head capsule width of *C. dilutus*.

For the dry mass parameter (Figure 2d), there was no significant difference of the treatments compared to the control. However, it is important to note that the dry mass values of the treatments, T2 (5.7 µg/L of thiamethoxam) and T15 (9.8 µg/L of thiamethoxam and 0.019 µg/L of lambda-cyhalothrin), were lower than the observed for the initial group. This may indicate that although the treatments did not cause effects on growth, they caused a loss in dry mass loss for organisms over the course of the exposure.

Discussion

In order to obtain a direct measurement of sediment toxicity or bioaccumulation, laboratory tests have been developed in which surrogate organisms are exposed to sediments under controlled conditions. The objective of a sediment test is to determine whether contaminants in sediment are harmful or bioaccumulated by benthic organisms [23, 21]. The 10-d larval growth and survival test with the midge *Chironomus tentans* (*C. dilutus*) is one of the most commonly used tests to verify sublethal effects in sediments [24,25]. *Hyallorella* and *Chironomus* are organisms that remain in intimate contact with the sediment as benthic organisms and show high control survival [25]. *Chironomus tentans* (*C. dilutus*) is an organism that has many desirable characteristics for sediment toxicity testing, including relative sensitivity to contaminants associated with sediment, direct contact with sediment, ease of culture in the laboratory, tolerance to varying physico-chemical characteristics of

sediment, and short generation time. Their response has been evaluated in inter-laboratory studies and has been confirmed with natural benthic populations [21].

Chironomid spp. populations are found in abundance in irrigated rice farming environments in southern Brazil. Chironomids can be very good bio-indicators of environmental impact in tropical lowlands. In these agricultural ecosystems, organisms are rarely exposed to single contaminants. There are three types of the combined actions that can be seen occurring in nature [26]. The first type of action occurs when compounds act independently and toxicity can be predicted from the isolated compounds. The second type of action occurs when compounds act independently but in a similar way, allowing one compound to be substituted for a second without altering the toxicity of the mixture. The third type of action is called synergism. With synergism, the effects are greater than the predicted for the isolated compounds [26].

It is likely that the concentrations tested in this study were not high enough to negatively impact the survival and growth of *C. dilutus*. It is also possible that the active ingredients were not readily available in the environment, not causing any deleterious effects on organisms. Lambda-cyhalothrin is a lipophilic compound which binds rapidly to organic matter and sediment particles, resulting in their rapid dissipation in the water column [8]. The toxicity for invertebrates increases when organisms use organic matter and sediment as food source. If they do not use them as a food source, they may not display signs of toxicity [9]. This may have occurred in this research, since it was not observed toxicity of the active ingredients on *C. dilutus*. Lambda-cyhalothrin has low acute toxicity to aquatic organisms, however, its chronic toxicity can be 20-30 times higher [12]. In the present research we have investigated the acute toxicity of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin on *C. dilutus*. It is possible that the effects of chronic toxicity of these compounds on *C. dilutus* to be more observable. Yet, others insects such as Ephemeroptera, Trichoptera and Plecoptera may be

more sensitives compared with Chironomidae spp. Insect larvae of Chironomidae are among the least sensitive groups in toxicity tests with lambda-cyhalothrin, with EC50 (48h) values higher than 100 ng L⁻¹ [27].

In contrast to lambda-cyhalothrin, thiamethoxam has high solubility in water [19] and high leaching capacity [14]. However, studies have showed that neonicotinoids are less toxic for invertebrates than pyrethroids [28]. There are few studies on the acute toxicity of thiamethoxam in aquatic organisms. Insects of the genus *Chironomus* sp. had a thiamethoxam LC50 of 35 (33-38) µg L⁻¹ (48h) in laboratory tests [29].

Although significant effects of the active ingredients on body length and head capsule width of *C. dilutus* were not observed, the loss of dry matter observed on organisms from the treatments compared to the initial group shows that thiamethoxam and lambda-cyhalothrin may interfere in the development of organisms. The effects of imidacloprid and cyfluthrin to the Fathead Minnow *Pimephales promelas* and the amphipod *Hyalella Azteca* [2] observed synergistic effects of mixing. Lambda-cyhalothrin, imidacloprid and cadmium combinations resulted in synergistic effects on *Eisenia fetida* (redworm), while binary mixtures with imidacloprid resulted in antagonistic effects. It was found that there were more significant effects in ternary blends with this insecticide [30]. In previous literature, mixtures of pyrethroids and neonicotinoids have shown increased mortality on first instar midge larvae of the non-target aquatic organism, *Chironomus riparius*. However, the fertility of the organisms was not affected and the deleterious effects were not amplified by the combination of pesticides, which have already shown evidence of antagonism [31].

Additionally, in nature there are a number of environmental factors that may interact causing a reduction or increase in the toxicity of compounds to aquatic organisms. It has been shown in previous literature that fluctuations in temperature may negatively influence the toxicity of pesticides to aquatic organisms [22]. For instance, temperature influenced the

toxicity of the neonicotinoid imidacloprid for *Chironomus dilutus* by reducing body length of the organisms [32].

Environmental risk assessments are important to understand the relationship between the concentration of a substance in the environment and its effects on organisms [33]. This study showed that the combinations of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin did not cause significant effects on *C. dilutus*. However, there is still little knowledge about potential interactions between pyrethroids and neonicotinoids and their effects on non-target aquatic organisms. More research is needed especially in areas where this combination has been the standard practice, as in the case of irrigated rice fields.

Conclusion

The results of the present study demonstrate that there was no significant difference on body length, head capsule width and dry mass of *C. dilutus* organisms after exposure individual to thiamethoxam and lambda-cyhalothrin and in co-exposure. Thiamethoxam LC50 showed a value of 15.6 µg/L for *C. dilutus*.

Acknowledgements

We would like to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) in Brazil for the exchange scholarship to the first author. To the Department of Environmental Toxicology and to The Institute of Environmental and Human Health (TIEHH) from Texas Tech University, for the infrastructure for research.

References

- [1] SOSBAI. Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado. 2012. Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. In Reunião técnica da cultura do arroz irrigado, 29., Gravatal, 176p.

- [2] Lanteigne M, Whiting SA, Lydy MJ. 2015. Mixture toxicity of imidacloprid and cyfluthrin to two non-target species, the Fathead Minnow *Pimephales promelas* and the amphipod *Hyalella azteca*. *Arch Environ Contam Toxicol* 68:354-361.
- [3] MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015. Agrofit: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Available from: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>.
- [4] Ferreira E, Barrigossi JA. 2006. Produção e qualidade do grão do arroz irrigado infestado por adultos de percevejo-das-panículas. *Pesq. agropec. bras.* 41: 1083-1091.
- [5] Thatheyus AJ, Selvam A, Gnana D. 2013. Synthetic pyrethroids: toxicity and biodegradation. *Applied Ecology and Environmental Sciences* 1: 33-36.
- [6] Narahashi T. 1971. Mode of Action of Pyrethroids. *Bull Wld Hlth Org.* 44: 337-345.
- [7] Anadón A, Arés I, Martínez MA, Martínez-Larrañaga MR. 2013. Pyrethrins and Synthetic Pyrethroids: Use in Veterinary Medicine. *Natural Products* 137: 4061-4086.
- [8] Colombo R, Ferreira TCR, Alves AS, Carneiro RL, Lanza MRV. 2013. Application of the response surface and desirability design to the lambda-cyhalothryn degradation using photo-Fenton reaction. *Journal of Environmental Management* 118: 32-39.
- [9] Maul JD, Brennan AA, Harwood AD, Lydy MJ. 2008. Effect of sediment-associated pyrethroids, fipronil, and metabolites on *Chironomus tentans* growth rate, body mass, condition index, immobilization, and survival. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 2582–2590.
- [10] Siegfried B. 1993. Comparative toxicity of pyrethroid insecticides to terrestrial and aquatic insects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 1683-1689.
- [11] Xie J, Wang P, Liu J, Lv X.; Jiang D, Sun C. 2011. Photodegradation of lambda-cyhalothrin and cypermethrin in aqueous solution as affected by humic acid and/or copper:

intermediates and degradation pathways. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30: 2440-2448.

[12] Garcia M, Scheffczyk A, Garcia T, Römbke J. 2011. The effects of the insecticide lambda-Cyhalothrin on the earthworm *Eiseniafetida* under experimental conditions of tropical and temperate regions. *Environmental Pollution* 159: 398-400.

[13] Lauridsen RB, Friberg N. 2005. Stream macroinvertebrate drift response to pulsed exposure of the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin. *Environ Toxicol.* 20: 513-521.

[14] Morrissey CA, Mineau P, Devries JH, Sanchez-Bayo F, Liess M, Cavallaro, MC, Liber, K. 2015. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment International* 74: 291-303.

[15] Vehovszky A, Farkas A, Ács A, Stoliar O, Székács A, Mörtl M, Győri J. 2015. Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system. *Aquatic Toxicology* 167: 172-179.

[16] Goulson D. 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* 50: 977-987.

[17] Main AR, Michel NL, Cavallaro MC, Headley JV, Peru KM, Morrissey CA. 2016. Snowmelt transport of neonicotinoid insecticides to Canadian Prairie wetlands. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 215: 76-84.

[18] Urzedo APFM de, Rigitano RL de O, Guerreiro MC, Castro NR do A. 2006. Dissipação do inseticida tiametoxam em solos da região de Lavras – MG. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 16: 31-38.

[19] Scorza Júnior RP, Rigitano RLO. 2012. Sorção, degradação e lixiviação do inseticida tiametoxam em dois solos do Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 16: 564-572.

- [20] Sánchez-Bayo F, Tennekes HA, Goka K. 2013. Impact of systemic insecticides on organisms and ecosystems. In *Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies*, Prof. Stanislav Trdan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0958-7, InTech, DOI: 10.5772/52831. Available from: <<http://www.intechopen.com/books/insecticides-development-of-safer-and-more-effective-technologies/impact-of-systemic-insecticides-on-organisms-and-ecosystems>>.
- [21] U.S. Environmental Protection Agency. 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 2nd ed. EPA 600/R-99/064. Guidance Document. Washington, DC.
- [22] Wilming MM, Qin G, Maul JD. 2013. Effects of environmentally realistic daily temperature variation on pesticide toxicity to aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 2738-2745.
- [23] U.S. Environmental Protection Agency. 1994. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA 600/R-94/024. Guidance Document. Washington, DC. 1994.
- [24] Sibley PK, Benoit DA, Ankley GT. 1997. The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: relationship to reproduction and demographic endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 336-345.
- [25] Nebeker AV, Cairns MA, Gakstatter JH, Malueg KW, Schuytema GS, Krawczyk, DF. 1984. Biological methods for determining toxicity of contaminated freshwater sediments to invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3: 617-630.
- [26] Bliss CI. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol* 26: 585-615.
- [27] Schroer A.F. Belgers J.D. Brock T.C. Matser A.M. Maund S.J. Van den Brink P.J. 2004. Comparison of laboratory single species and field population-level effects of the

pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin on freshwater invertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol*. 46: 324-35.

[28] Barbee GC, Stout MJ. 2009. Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. *Pest Manag Sci* 65: 1250-1256.

[29] U.S. Environmental Protection Agency and Office of Pesticide Programs (USEPA). 2013. Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)). Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C.: EPA Office of Pesticides Program Database.

[30] Wang Y. Chen C. Qian Y. Zhao X. Wang Q. Kong X. 2015. Toxicity of mixtures of λ -cyhalothrin, imidacloprid and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111: 242-247.

[31] Kunce W. Josefsson S. Örborg J. Johansson F. 2015. Combination effects of pyrethroids and neonicotinoids on development and survival of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122: 426-431.

[32] Minton K.A. 2015. The Role of Temperature Variation in Neonicotinoid Toxicity and Species Sensitivity Distributions to Temperature. Master in Toxicology: Texas Tech University. 103p.

[33] Amiard-Triquet C. 2015. How to Improve Toxicity Assessment? From Single-Species Tests to Mesocosms and Field Studies. *In book: Aquatic Ecotoxicology* 127-151.

Table 1 – Treatments used to test the acute toxicity of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin for *C. dilutus*.

| Treatments | Thiamethoxam concentration (mg/L) | Lambda-cyhalothrin concentration (mg/L) |
|------------|--------------------------------------|--------------------------------------------|
| Control | 0 | 0 |
| T1 | 5.7 | 0 |
| T2 | 8.2 | 0 |
| T3 | 9.8 | 0 |
| T4 | 0 | 0.009 |
| T5 | 0 | 0.013 |
| T6 | 0 | 0.019 |
| T7 | 5.7 | 0.009 |
| T8 | 8.2 | 0.009 |
| T9 | 9.8 | 0.009 |
| T10 | 5.7 | 0.013 |
| T11 | 8.2 | 0.013 |
| T12 | 9.8 | 0.013 |
| T13 | 5.7 | 0.019 |
| T14 | 8.2 | 0.019 |
| T15 | 9.8 | 0.019 |

Table 2 – Conductivity, pH and dissolved oxygen (DO) from the water of the experimental units at day 0 (first day of the experiment) and day 10 (the last day of the experiment)

| Treatments | Day 0 | | | Day 10 | | |
|------------|-----------------------------------|------|-----------|-----------------------------------|------|-----------|
| | Conductivity ($\mu\text{S/cm}$) | pH | DO (mg/L) | Conductivity ($\mu\text{S/cm}$) | pH | DO (mg/L) |
| Control | 292 | 8.03 | 7.28 | 438 | 7.89 | 6.44 |
| T1 | 289.8 | 8.03 | 7.33 | 449 | 8.04 | 6.67 |
| T2 | 290.9 | 8.05 | 7.38 | 438 | 8.02 | 6.45 |
| T3 | 289.4 | 8.08 | 7.44 | 483 | 8.09 | 7.09 |
| T4 | 292.2 | 8.02 | 7.03 | 448 | 7.76 | 6.24 |
| T5 | 290.2 | 7.94 | 7.33 | 448 | 7.87 | 6.66 |
| T6 | 290.8 | 8.01 | 7.37 | 459 | 7.84 | 6.19 |
| T7 | 288 | 7.85 | 7.23 | 434 | 7.89 | 6.24 |
| T8 | 290.4 | 8.07 | 8.1 | 387 | 7.85 | 6.84 |
| T9 | 291.4 | 8.01 | 7.7 | 397 | 7.77 | 6.76 |
| T10 | 292.1 | 7.98 | 8.05 | 466 | 7.88 | 6.72 |
| T11 | 288.3 | 8.05 | 7.36 | 441 | 7.89 | 6.48 |
| T12 | 289.8 | 8.15 | 7.75 | 400 | 7.85 | 6.73 |
| T13 | 289.8 | 8.15 | 7.4 | 399 | 7.8 | 6.58 |
| T14 | 291.3 | 8.12 | 7.66 | 397 | 7.71 | 6.25 |
| T15 | 287.4 | 8.14 | 7.86 | 426 | 8.04 | 7.47 |

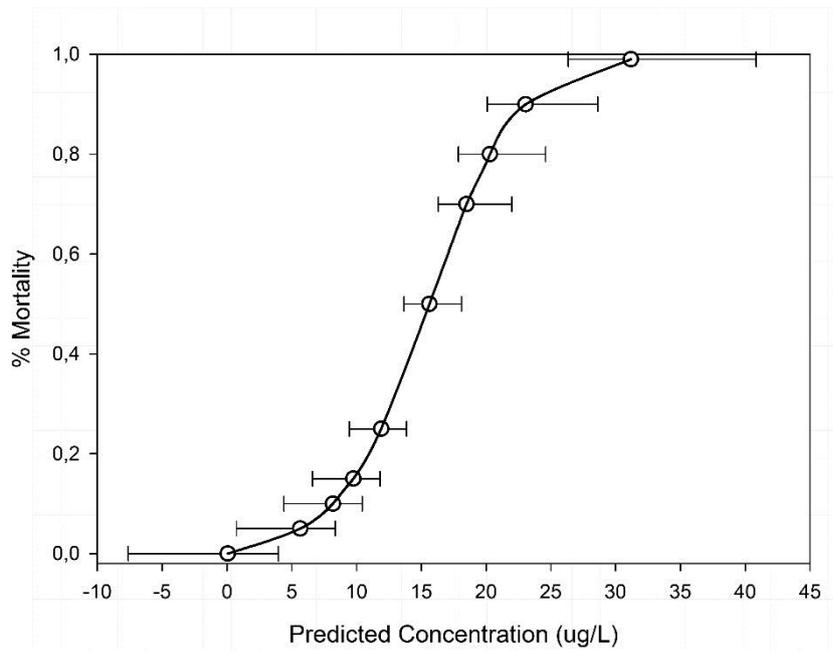


Figure 1. *Chironomus dilutus* LC50 ($\mu\text{g/L}$) after 10 d exposure to six concentrations of thiamethoxam. Error bars represent $\pm\text{SE}$ of the mean.

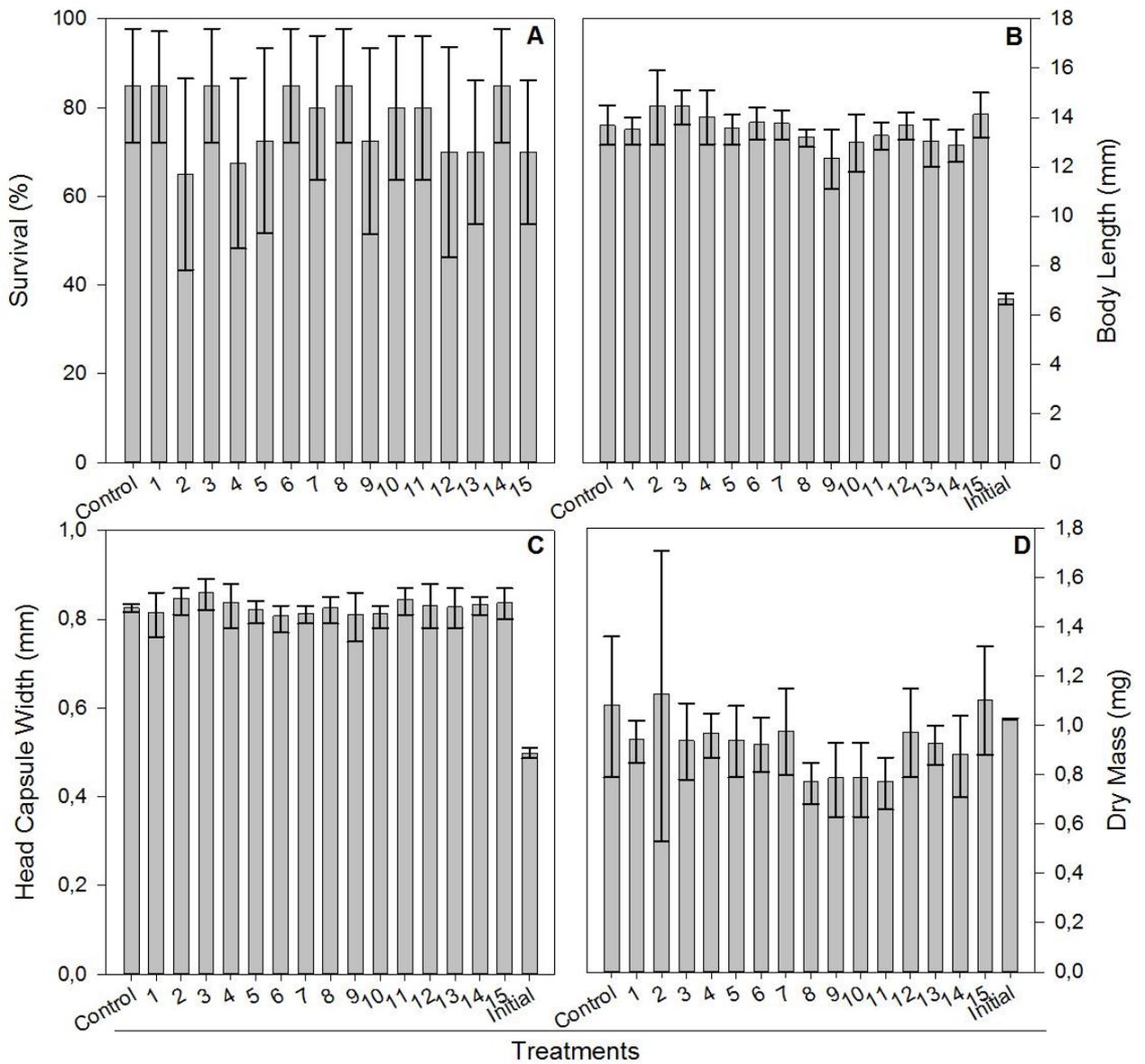


Figure 2. *Chironomus dilutus* survival (A), body length (B), head capsule width (C) and dry mass (D) after 10 d exposure to three concentrations of thiamethoxam and three concentrations of lambda-cyhalothrin and their combination. Error bars represent \pm SE of the mean.

3 DISCUSSÃO

A utilização intensiva de agrotóxicos na lavoura arrozeira tem levado a preocupações quanto ao impacto ambiental sobre a qualidade da água e alterações em comunidades de organismos não alvos. Atualmente, há relativamente poucos estudos que relatam a toxicidade em trabalhos de campo. Segundo Simpson & Roger (1995), os resultados obtidos de experimentos de laboratório devem ser extrapolados com cuidado para resultados de campo, visto que no meio ambiente há uma diversidade de fatores envolvidos e as respostas de toxicidade em condições laboratoriais podem não ser as mesmas que as obtidas em ensaios a campo. Dessa forma, os autores consideram de suma importância a realização de testes laboratoriais como complemento aos ensaios de campo, a fim de obter resultados mais precisos quanto à toxicidade das substâncias em estudo.

Muitas vezes, resultados de trabalhos de campo são mais difíceis de interpretar em virtude de que no ambiente natural há diversos fatores bióticos e abióticos, e interações que ocorrem entre eles. Segundo Willming et al. (2013), flutuações na temperatura podem influenciar na habilidade dos organismos em detoxificar xenobióticos, alterando a absorção de contaminantes, as taxas de eliminação e biotransformação, resultando em alterações na toxicidade e nos processos de toxicodinâmica dos agrotóxicos nos organismos. Camargo (2010) cita que as oscilações diárias de temperatura podem não representar estresse para organismos bentônicos em habitats maiores e mais estáveis que a lavoura de arroz. No entanto, para esse agroecossistema, tais mudanças podem ser drásticas o suficiente para dificultar o estabelecimento de indivíduos estrategistas K e, dessa forma, impedir um avanço no processo sucessional.

O oxigênio que provém da atmosfera dissolve-se nas águas naturais devido à diferença de pressão parcial. Os níveis de oxigênio dissolvido indicam a capacidade de um corpo d'água natural em manter a vida aquática (CETESB, 2009). Segundo Esteves (1998), o oxigênio dissolvido é fundamental para o desenvolvimento das comunidades aquáticas, sendo que as concentrações desse gás definem as condições de habitabilidade nos ecossistemas. Piedras et al. (2006) verificaram que a abundância de oligoquetas foi relacionada com a diminuição na concentração de oxigênio dissolvido na água, que é característica de locais impactados por poluição orgânica.

O potencial hidrogeniônico (pH) da água é um parâmetro importante nos estudos de qualidade ambiental. A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos dá-se diretamente

devido a seus efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies. Também o efeito indireto do pH da água pode ser muito importante, pois contribui para a precipitação de elementos químicos tóxicos e as solubilidades de nutrientes. Os critérios de proteção à vida aquática fixam o pH entre 6 e 9 (CETESB, 2009). Segundo Krebs (1994), baixos valores de pH parecem não influenciar diretamente sobre peixes adultos, no entanto, influenciam a sobrevivência de juvenis após eclosão. Baixos valores de pH também influenciam a sobrevivência e reprodução de muitos invertebrados aquáticos, que servem de alimento para peixes juvenis e adultos.

Dentre os organismos aquáticos não alvos que habitam as lavouras de arroz irrigado, destacam-se os macroinvertebrados bentônicos. Os macroinvertebrados bentônicos correspondem a um conjunto de organismos que vivem todo ou parte de seu ciclo de vida no substrato de fundo de ambientes aquáticos (CETESB, 2009). A utilização de macroinvertebrados aquáticos no diagnóstico de qualidade de ecossistemas aquáticos continentais remonta ao início do século XX (KUHLMANN et al., 2012). Essa comunidade é muito utilizada em atividades de biomonitoramento em vários países, porque ocorrem em todo tipo de ecossistema aquático, exibem ampla variedade de tolerâncias e tipos de poluição e estão constantemente sujeitos às alterações de qualidade do meio aquático (CETESB, 2009). Devido a sua importância e porque são organismos fáceis de identificar e respondem de forma satisfatória às alterações ambientais, os macroinvertebrados bentônicos foram escolhidos como comunidade bioindicadora no presente trabalho.

Destaca-se, entretanto, que trabalhar com bioindicadores exige metodologia específica para que os resultados obtidos possam refletir adequadamente as condições ambientais. Atualmente, há diversos métodos de amostragem para macroinvertebrados aquáticos bentônicos, os quais dependem do local o qual objetiva-se amostrar, sejam ambientes lênticos ou lóticos. As lavouras de arroz irrigado são áreas que geralmente possuem um baixo nível de lâmina de água (de 10 a 15 cm) e, para estas áreas, o *Corer* foi utilizado como instrumento de coleta em alguns estudos (SOSINSKI & PERERA, 2011; BAUMART & SANTOS, 2011). Na presente pesquisa, optou-se também pelo *Corer* para coleta dos macroinvertebrados bentônicos, visto ter sido adequado em outros estudos na mesma área experimental. No entanto, é importante lembrar que cada área possui suas particularidades e, o número de amostras para um determinado local pode não ser o mesmo número ideal de coletas para amostragens em áreas de terras baixas, onde se cultiva o arroz irrigado. Objetivando padronizar o esforço amostral para este tipo de ambiente, realizou-se uma análise de suficiência amostral a qual determinou o número mínimo de amostras para que fosse possível obter o maior número de organismos, sem perda de informação (artigo 1). Tal definição é

importante para auxiliar outras pesquisas realizadas neste tipo de ambiente com este mesmo método de amostragem.

Considerando que resultados de trabalhos de campo são mais confiáveis quando realizados mais de um ano, optou-se por repetir a pesquisa em dois anos (safras 2012/13 e 2013/14). Isto é importante porque muitas vezes um ano pode ser considerado atípico, apresentando maior temperatura ou precipitação, o que pode causar interpretações errôneas em relação aos resultados obtidos. De modo geral, observou-se que a fauna encontrada nos dois anos amostrais foi semelhante, o que indica que a lavoura de arroz irrigado é um ambiente adequado para o desenvolvimento de determinados grupos de animais. Sosinski & Perera (2011) destacam que os organismos que colonizam as lavouras de arroz irrigado são, em sua maioria, oportunistas, os quais possuem características fisiológicas e comportamentais que os permitem sobreviver às mudanças deste ambiente.

Na presente tese, pode-se observar que o estabelecimento da comunidade de macroinvertebrados bentônicos é favorecido quando em ambiente natural, livre de agrotóxicos e sem plantas de arroz. Entretanto, a aplicação de apenas uma dose dos fungicidas trifloxistrobina + tebuconazol e triciclazol e dos inseticidas lambda-cialotrina + tiametoxam e diflubenzuron não ocasiona efeitos significativos sobre a riqueza e densidade de macroinvertebrados (artigo 2). Simpson & Roger (1995) destacam que quando os agrotóxicos são aplicados no terço final de desenvolvimento da cultura, como é o caso dos fungicidas e inseticidas, uma significativa proporção desses podem ser interceptados pelas plantas de arroz e assim, baixa concentração deve chegar à água.

Embora muitos agrotóxicos não sejam capazes de provocar efeitos agudos e imediatos sobre os organismos, podem reduzir a sobrevivência destes através de lesões crônicas que se manifestam em longo prazo, como desordens fisiológicas ou alterações genéticas (KRUGER, 2009). Para Motter et al. (2004), análises laboratoriais são necessárias para verificar a bioatividade de substâncias frente aos organismos aquáticos, visto que os agentes tóxicos podem promover reações adversas que podem ser detectadas por meio de análise morfológica de tecidos que estejam em contato com eles. Uma das possíveis reações celulares frente às substâncias externas é o aumento ou diminuição dos índices proliferativos. Os mesmos autores observaram que o aumento no índice mitótico pode estar associado às alterações físico-químicas do meio externo, provocadas por ação do composto em estudo, o que pode causar uma resposta a fim de se proteger de uma substância agressiva. Neste contexto, realizou-se um experimento em condições laboratoriais a fim de investigar o potencial genotóxico do produto que mais persistiu na água da lavoura nos resultados em campo, o

tricyclazol (artigo 3), utilizando-se para isso um bioindicador, o *Allium cepa*. Os resultados obtidos permitiram concluir que a aplicação do fungicida tricyclazol causa aumento da atividade genotóxica na água de irrigação da lavoura de arroz, através do aparecimento de alterações cromossômicas, sem, contudo, causar efeitos significativos sobre o índice mitótico.

A toxicidade de agrotóxicos sobre organismos aquáticos não alvos pode ocorrer de diversas formas. Além de efeitos genotóxicos, alterações no crescimento, reprodução e até mesmo na sobrevivência de espécies sensíveis podem ser usados como parâmetros em estudos de toxicidade aguda e crônica (SANCHO et al, 2016). Outro fato importante a considerar é que na natureza raramente as substâncias encontram-se isoladas, sendo o efeito causado apenas por um determinado fator. Bliss, já em 1939, escreveu que há três tipos de ações combinadas que ocorrem na natureza. A primeira ocorre quando os compostos agem independentemente e a toxicidade resulta dos efeitos isolados de cada substância. A segunda ocorre quando os compostos agem independentemente, porém, apresentam formas similares de ação, onde um composto pode ser substituído por outro sem, contudo, alterar a toxicidade da mistura. No terceiro tipo, ocorre o sinergismo, onde os efeitos advindos dos compostos em mistura são maiores do que aqueles verificados quando cada composto encontra-se isolado. Em relação a este último comportamento, Perez et al. (2013) observou que larvas do peixe-zebra (*Danio rerio*) mostraram mudanças no comportamento natatório e inibição da enzima Acetil-colinesterase quando expostos a combinações de clorpirifós com atrazina e terbutilazine, os quais ocasionaram efeitos sinérgicos.

Tendo em vista o exposto, a presente tese objetivou também verificar a toxicidade da mistura de dois princípios ativos bastante utilizados na lavoura de arroz irrigado no sul do Brasil, tiametoxam e lambda-cialotrina (artigo 4) sobre indivíduos da espécie *Chironomus dilutus*. No entanto, os resultados mostraram que as doses testadas, seja dos princípios ativos isolados ou em misturas, não ocasionaram alterações significativas na sobrevivência, comprimento do corpo, largura da cabeça e massa seca dos organismos.

Os resultados obtidos na presente tese permitiram ampliar as informações em relação a toxicidade de importantes fungicidas e inseticidas da lavoura arrozeira e seus efeitos sobre a comunidade de macroinvertebrados aquáticos bentônicos. No entanto, são necessários outros estudos mais aprofundados sobre a toxicidade dos metabólitos advindos da degradação destes princípios ativos. Além disso, estudos podem ser feitos com outros grupos de organismos, tais como o zooplâncton e peixes, a fim de observar o comportamento destes agrotóxicos sobre toda a cadeia alimentar.

4 CONCLUSÕES

Em estudos de impacto ambiental com a comunidade de macroinvertebrados bentônicos em área de cultivo de arroz irrigado, recomenda-se a coleta de no mínimo 10 réplicas de solo, considerando o método de amostragem descrito no presente trabalho (*Corer*), a fim de obter o maior número de famílias sem perda de informação.

O estabelecimento da comunidade de macroinvertebrados bentônicos é favorecido quando em ambiente natural, livre de agrotóxicos e sem plantas de arroz. Entretanto, a aplicação de apenas uma dose dos fungicidas trifloxistrobina + tebuconazol e triciclazol e dos inseticidas lambda-cialotrina + tiametoxam e diflubenzuron não ocasiona efeitos significativos sobre a riqueza e densidade de macroinvertebrados. Tebuconazol, triciclazol e tiametoxam apresentam elevada persistência na água de irrigação da lavoura de arroz irrigado, sendo necessário o cuidado quanto às doses e número de aplicações destes produtos na lavoura, a fim de evitar a contaminação ambiental.

Triciclazol causa aumento da atividade genotóxica na água de irrigação da lavoura de arroz, através do aparecimento de alterações cromossômicas, no bioindicador *Allium cepa*.

As doses testadas do piretróide lambda-cialotrina e do neonicotinóide tiametoxam, isolados ou em misturas, não causam alterações significativas sobre organismos da espécie *Chironomus dilutus*, em estudos laboratoriais.

REFERÊNCIAS

ADAM, O. et al. Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, n.2, p. 441-449, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768221>>. Acesso em: 21 set. 2014. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.07.017.

ANDERSON, J.C. et al. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. **Science of The Total Environment**, v.505, p.409-422, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714014120>>. Acesso em: 28 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.09.090.

ANDREU-SANCHEZ, O. et al. Acute toxicity and bioconcentration of fungicide tebuconazole in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology**, v.27, n.2, p. 109-116, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21702075>>. Acesso em: 15 ago. 2015. DOI: 10.1002/tox.20618.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos e Toxicologia: **Monografia de agrotóxicos**. Disponível em: <www.portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home>. Acesso em: 10 fev. 2014.

BAMBARADENIYA, C.N.B.; AMERASINGHE, F.P. **Biodiversity associated with the rice field agroecosystem in Asian countries**: A brief review. Working Paper 63. Colombo, Sri Lanka: International Water Management institute, 2003.

BAMBARADENIYA, C.N.B. et al. Biodiversity associated with an irrigated rice agroecosystem in Sri Lanka. **Biodiversity and Conservation**, v.13, n. 9, p.1715-1753, 2004. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1023%2FB%3ABIOC.0000029331.92656.de>>. Acesso em: 5 set. 2015.

BARBEE, G.C., STOUT, M.J. Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. **Pest Management Science**, v.65, p.250-1256, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19623546>>. Acesso em: 5 jan. 2015. DOI: 10.1002/ps.1817.

BAUMART, J.S.; SANTOS, S. The impact of herbicides on benthic organisms in flooded rice fields in Southern Brazil. In: **Herbicides and Environmental**. Edited by Andreas Kortekamp. Intech, p.369-382, 2011.

BAURAND, P.E. et al. Genotoxicity assessment of pesticides on terrestrial snail embryos by analysis of random amplified polymorphic DNA profiles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 298, p. 320-327, 2015. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389415004471>>. Acesso em: 20 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2015.05.051.

BLISS, C.I. The toxicity of poisons applied jointly. **Ann Appl Biol**, n. 26, p.585-615, 1939. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744->

[7348.1939.tb06990.x/abstract](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219414003822)>. Acesso em: 10 ago. 2015. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x.

BREDESON, M.M. et al. The effects of insecticide dose and herbivore density on tri-trophic effects of thiamethoxam in a system involving wheat, aphids, and ladybeetles. **Crop Protection**, v. 69, p. 70-76, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219414003822>>. Acesso em: 21 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.cropro.2014.12.010.

CAMARGO, B. V. **Macroinvertebrados da lavoura de arroz irrigado tratada com os agrotóxicos carbofuran e penoxsulam**. 2010. 47f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

CAO, M. et al. Track of fate and primary metabolism of trifloxystrobin in rice paddy ecosystem. **Science of the Total Environment**, v.518-519, p.417-423, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969715002946>. Acesso em: 23 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.028.

CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo - Serie Relatos: significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem**. 44p. 2009.

CHANG, J.; et al. Bioaccumulation and enantioselectivity of type I and type II pyrethroid pesticides in earthworm. **Chemosphere**, v. 144, p. 1351-1357, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653515302071>>. Acesso em: 25 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.011.

COLOMBO, R. et al. Application of the response surface and desirability design to the lambda-cyhalothryn degradation using photo-Fenton reaction. **Journal of Environmental Management**, v.118, p.32-39, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479713000054>>. Acesso em: 5 jan. 2015. DOI: 10.1016/j.jenvman.2012.12.035.

COLPO, K.D.; BRASIL, M.T.; CAMARGO, B.V. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores do impacto ambiental promovidos pelos efluentes de áreas rizícolas e pelos de origem urbana/industrial. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2087-2092, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000700020>. Acesso em: 17 mar. 2014. DOI: 10.1590/S0103-84782009005000161.

DEMIRCI, O. et al. The effects of atrazine and thiamethoxam at sublethal concentrations on some antioxidant enzymes of *Gammarus kischineffensis*. **Toxicology Letters**, v. 238, n. 2, Suplemento, p. S131, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427415023528>>. Acesso em: 22 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.08.413.

DIMITROV, M.R. et al. Assessing effects of the fungicide tebuconazole to heterotrophic microbes in aquatic microcosms. **Science of the Total Environment**, v. 490, p.1002-1011, 2014. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714007530>>. Acesso em: 27 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.073.

ESTEVEES, F. de A. **Fundamentos de Limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro : Interciência. 226p. 1998.

EUROPEAN COMMISSION. **Trifloxystrobin**. 39p. 2003. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list1-18_en.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2015.

FELD, C.K.; HERING, D. Community structure or function: effects of environmental stress on benthic macroinvertebrates at different spatial scales. **Freshwater Biology**, v.52, n.7, p.1380-1399, 2007. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2427.2007.01749.x/abstract>>. Acesso em: 13 abr. 2013. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2007.01749.x.

FISHER, S. A.; HALL, L. W. Environmental concentrations and aquatic toxicity data on diflufenzuron (Dimilin). **Crit. Rev. Toxicol.**, v.22, n.1, p.45-79. 1992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1616600>>. Acesso em: 13 abr. 2013. DOI: 10.3109/10408449209145321.

GAMBOA, M.; REYES, R.; ARRIVILLAGA, J. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de salud ambiental. **Boletín de Malariologia y Salud Ambiental**, v.48, n.2, p.109-120, 2008. Disponível e: < <http://www.scielo.org.ve/pdf/bmsa/v48n2/art01.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2014.

GOLOMBIESKI, J.I. et al. Efeitos do carbofurano, metsulfurom-metílico e azinsulfurom na sobrevivência de carpas e produção de arroz e peixes em rizipiscicultura. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, p. 59-66, 2007. Disponível em: < <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/pesticidas/article/view/7757>>. Acesso em: 25 abr. 2014. DOI: 10.5380/pes.v17i0.7757.

INCHEM. INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Disponível em: <http://www.inchem.org/>. Acesso em: 01 nov.13.

JUNGES, C.M. et al. Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction. **Chemosphere**, v.87, n.11, p.1348-1354, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22386454>. Acesso em: 3 set. 2015. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.02.026.

KOAKOSKI, G. et al. Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. **Chemosphere**, v.112, p. 85-91, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25048892>>. Acesso em: 20 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.083.

KREBS, C.J. **Ecology**: the experimental analysis of distribution and abundance. 4 th ed. 801p. 1994.

KREUTZ, L.C. et al. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciencia Rural**, v.38, n.4, p.1050-1055, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008000400022&script=sci_arttext>. Acesso em: 28 nov. 2014. DOI: 10.1590/S0103-84782008000400022.

KRUGER, R.A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***. 2009. 58f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental). Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS, 2009.

KUHLMANN, M.L. et al. **Protocolo para o biomonitoramento com as comunidades bentônicas de rios e reservatórios do estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2012. 113p.

KUMAR, V. A. et al. Effect of thiamethoxam alters serum biochemical parameters in *Channa punctatus* (Bloch). **Asian Journal of Bio Science**, v.5, n.1, p.106-110, 2010. Disponível em: < <http://www.cabdirect.org/abstracts/20103272104.html>>. Acesso em: 28 nov. 2014.

KUTLUYER, F. et al. The in vitro effect of Lambda-cyhalothrin on quality and antioxidant responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 855-860, 2015. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668915300971>>. Acesso em: 29 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.etap.2015.09.018.

LAWLER, S.P. Rice fields as temporary wetlands: a review. **Israel Journal of Zoology**, v.47, p.513-528, 2001. Disponível em: < http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1560/X7K3-9JG8-MH2J-XGX1#.VmBy_bgrLIU>. Acesso em: 20 nov. 2015. DOI: 10.1560/X7K3-9JG8-MH2J-XGX1.

LEITÃO, S.; et al. Spatial and temporal variability of macroinvertebrate communities in two farmed Mediterranean rice fields. **Aquatic Ecology**, v.41, p.373-386, 2007. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10452-007-9082-6#page-1>>. Acesso em: 19 out. 2014. DOI: 10.1007/s10452-007-9082-6.

LI, Y. et al. Enantioselectivity in tebuconazole and myclobutanil non-target toxicity and degradation in soils. **Chemosphere**, v.122, p.145-153, 2015. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514013496>>. Acesso em: 30 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.11.031.

LIBER, K., SCHMUDE, K.L., CORRY, T.D. Effects of the Insect Growth Regulator Diflubenzuron on Insect Emergence within Littoral Enclosures. **Environ. Entomol.**, v.25, n.1, p.17-24, 1996. Disponível em: < <http://ee.oxfordjournals.org/content/25/1/17>>. Acesso em: 28 nov. 2014. DOI: 10.1093/ee/25.1.17.

LIU, L. et al. Toxic effects of three strobilurins (trifloxystrobin, azoxystrobin and kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.98, n.1, p. 297-302, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24210350>>. Acesso em: 14 fev. 2015. DOI:10.1016/j.ecoenv.2013.10.011

LIU, N. et al. Stereoselective Determination of Tebuconazole in Water and Zebrafish by Supercritical Fluid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 28, p. 6297-303, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26125486>>. Acesso em: 20 nov. 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02450.

LUPI, D. et al. Benthic macroinvertebrates in Italian rice fields. **Journal of Limnology**, v.72, n.1, p.184-200, 2013. Disponível em: <<http://www.jlimnol.it/index.php/jlimnol/article/view/jlimnol.2013.e15>>. Acesso em: 22 mar. 2015. DOI: 10.4081/jlimnol.2013.e15.

MABURY, S.A.; CROSBY.D.G. Fate and disposition of diflufenzuron in rice fields.**Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 11, p. 1908–1913, 1996. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620151108/abstract>. Acesso em: 5 nov. 2014. DOI: 10.1002/etc.5620151108.

MAIN, A.R. et al. Snowmelt transport of neonicotinoid insecticides to Canadian Prairie wetlands. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 215, p.76-84, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880915300785>>. Acesso em: 26 nov. 2015. doi: 10.1016/j.agee.2015.09.011.

MAUL, J.D. et al. Partitioning and matrix-specific toxicity of bifenthrin among sediments and leaf-sourced organic matter. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 945–952, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18333691>>. Acesso em: 8 nov. 2014. DOI: 10.1897/07-404.1.

MIZE, S.V.; PORTER, S.D.; DEMCHECK, D.K. Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities instreams of southwestern Louisiana, USA. **Environmental Pollution**, v.152, p. 491-503, 2008. Disponível em: <<https://pubs.er.usgs.gov/publication/70033664>>. Acesso em: 8 nov. 2014. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.03.021.

MOLOZZI, J.; HEPP, L. U.; DIAS, A. DA S. Influence of rice crop on the benthic community in Itajaí Valley (Santa Catarina, Brazil).**Acta Limnologica Brasiliensia**, v.19, n.4, p. 383-392, 2007. Disponível em: <http://www.ablimno.org.br/acta/pdf/acta19_vol4_02.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2014.

MORRISON, S.A. et al. Acute toxicity of pyraclostrobin and trifloxystrobin to *Hyaella azteca*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.32, n.7, p.1516-1525, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554042>>. Acesso em: 14 fev. 2015. DOI: 10.1002/etc.2228.

MORRISSEY, C.A. et al. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. **Environment International**, v. 74, p.291-303, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412014003183>>. Acesso em: 23 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.envint.2014.10.024.

MOTTER, M.D.S.; et al. Índice mitótico em células epiteliais da brânquia de Guaru (*Poecilia vivipara*) tratados com frações da casca do caule e da folha de pequi (*Caryocar brasiliensis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, n.4, p. 221-227, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-95962004000400001&script=sci_arttext>. Acesso em: 16 maio 2014. DOI: 10.1590/S1413-95962004000400001.

OCHOA-ACUNA, H.G. et al. Toxicity of soybean rust fungicides to freshwater algae and *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v.18, n.4, p.440-446, 2009. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19184419>>. Acesso em: 25 nov. 2014. doi: 10.1007/s10646-009-0298-1.

O'HALLORAN, S.L., et al. Effects of diflufenuron on benthic macroinvertebrates in littoral enclosures. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.30, n.4, p.444-451, 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8661519>>. Acesso em: 17 jun. 2014.

PADOVANI, L. et al. Monitoring tricyclazole residues in rice paddy watersheds. **Chemosphere**, v.62, n.2, p.303-314, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996714>>. Acesso em: 3 out. 2014. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.05.025.

PAN, D.Y., LIANG, X.M. Safety study of pesticides on bog frog, a predatory natural enemy of pest in paddy field. **Journal of Hunan Agricultural College**, v.19, n.1, p.47-54, 1993. Disponível em: < <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CN9344132>>. Acesso em: 5 out. 2014.

PÉREZ, J., et al. Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. **Environ Sci Pollut Res**, v. 20, p.4671-4680, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-012-1443-6>>. Acesso em: 18 nov. 2015. DOI: 10.1007/s11356-012-1443-6.

PIEDRAS, S. R. N.; et al. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores de qualidade de água na Barragem Santa Bárbara, Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.494-500, 2006. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782006000200020&script=sci_arttext>. Acesso em: 29 abr. 2015. DOI: 10.1590/S0103-84782006000200020.

RIZO-PATRÓN V.F. et al. Macroinvertebrate communities as bioindicators of water quality in conventional and organic irrigated rice fields in Guanacaste, Costa Rica. **Ecological Indicators**, v. 29, p. 68-78. 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470160X12004244>>. Acesso em: 22 set. 2014. DOI: 10.1016/j.ecolind.2012.12.013.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. eds. **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall. 1993. 488p.

ROSSARO, B; CORTESI, P. The effects of tricyclazole treatment on aquatic macroinvertebrates in the field and in laboratory. **Journal of Entomological and Acarological Research**. v.45, n.23, p. 128-136, 2013. Disponível em: < <http://www.pagepressjournals.org/index.php/jear/article/view/jear.2013.e23>>. Acesso em: 22 set. 2014. DOI: 10.4081/jear.2013.e23.

SANCHO, E. et al. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.150, p. 25-32, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19217945>>. Acesso em: 12 dez. 2014. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.02.004.

SANCHO, E. et al. Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 10-17, 2016. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651315301081>>. Acesso em: 22 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.034.

SCHROER, A.F.W., et al. Comparison of laboratory single species and field population-level effects of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin on freshwater invertebrates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.46, n.3, p.324-335, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15195804>>. Acesso em: 18 out. 2014. DOI: 10.1007/s00244-003-2315-3.

SIMPSON, I.C.; ROGER, P.A. **The impact of pesticides on nontarget aquatic invertebrates in wetland ricefields**: a review. In: PINGALI, P.; ROGER, P. (eds) Impact of pesticides on farmer health and the rice environment. KAP, London, pp 249-305, 1995.

SOSBAI. SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 29., Gravatal, 2012. 176p.

SOSBAI. SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 30., Bento Gonçalves, 2014. 192p.

SOSINSKI, L.T.W.; PERERA, M.B. **Levantamento da comunidade de macroinvertebrados bentônicos em lavouras de arroz irrigado**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 148, Embrapa, 2011. 30p.

STENERT, C.; et al. Can hydrologic management practices of rice fields contribute to macroinvertebrate conservation in southern Brazil wetlands? **Hydrobiologia**, v. 635, p. 339-350, 2009. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10750-009-9926-2#page-1>>. Acesso em: 20 out. 2015. DOI: 10.1007/s10750-009-9926-2.

STENERT, C. et al. Diversity of aquatic invertebrates in rice fields in southern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v.7, n.1, p.67-77, 2012. Disponível em: < <http://revistas.unisinos.br/index.php/neotropical/article/view/nbc.2012.71.09>>. Acesso em: 22 out. 2014. DOI: 10.4013/nbc.2012.71.09.

STORCK, V. et al. Identification and characterization of tebuconazole transformation products in soil by combining suspect screening and molecular typology. **Environmental Pollution**, v. 208 (Pt B), p. 537-545, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749115301287>. Acesso em 20 nov. 2015. doi: 10.1016/j.envpol.2015.10.027.

SUHLING, F.; et al. Effects of insecticide applications on macroinvertebrate density and biomass in rice-fields in the Rhône-delta, France. **Hydrobiologia**, v.431, p.69-79, 2000. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1004006422334#page-1>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

TAILLEBOIS, E. et al. Synthesis and biological activity of fluorescent neonicotinoid insecticide thiamethoxam. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.24, n.15, p. 3552-3555, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X14005526>>. Acesso em: 28 nov. 2015. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.05.052.

TREMOLADA, P., et al. Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment. **Aquatic Toxicology**, v.67, n.1, p.87-103, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X03002492>>. Acesso em: 3 nov. 2014. DOI: 10.1016/j.aquatox.2003.12.003.

TU, W. et al. Acute exposure to synthetic pyrethroids causes bioconcentration and disruption of the hypothalamus–pituitary–thyroid axis in zebrafish embryos. **Science of The Total Environment**, v. 542, Part A, p.876-885, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969715309475>>. Acesso em: 24 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.131.

TU, W. et al. Dynamics of uptake and elimination of pyrethroid insecticides in zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.107, p. 186-191, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765131400222X>>. Acesso em: 20 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.05.013.

UĞURLU, P. et al. The toxicological effects of thiamethoxam on *Gammarus kischineffensis* (Schellenberg 1937) (Crustacea: Amphipoda). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.39, n. 2, p. 720-726, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668915000307>>. Acesso em: 25 nov. 2015. doi: 10.1016/j.etap.2015.01.013.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY AND OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS. **Pesticide Ecotoxicity Database** (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)). Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C.: EPA Office of Pesticides Program Database. 2013. Disponível em: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/help.cfm?help_id=DATASTEWARD&help_type=define&help_ack=1>. Acesso em: 20 mar. 2015.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. ECOTOX Database. Disponível em: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.htm>. Acesso em: 11 abr. 2015.

VEHOVSZKY, A. et al. Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system. **Aquatic Toxicology**, v.167, p. 172-179, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26340121>>. Acesso em: 27 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.08.009.

WANG, Y. et al. Toxicity of mixtures of λ -cyhalothrin, imidacloprid and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 242-247, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651314004813>>. Acesso em: 23 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.10.015.

WIELOGÓRSKA, E. et al. Endocrine disruptor activity of multiple environmental food chain contaminants. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n.1, p. 211-220, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233314002057>>. Acesso em: 22 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.10.014.

WILLMING, M. M., QIN, G., MAUL, J. D. Effects of environmentally realistic daily temperature variation on pesticide toxicity to aquatic invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 12, p.2738-2745, 2013. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23955707>>. Acesso em: 14 set. 2015. DOI: 10.1002/etc.2354.

ZHANG, Q. et al. Study on the stereoselective degradation of three triazole fungicides in sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 117, p. 1-6, 2015. . Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765131500113X>>. Acesso em: 24 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.03.014.

ZHU, L. et al. Effect of trifloxystrobin on hatching, survival, and gene expression of endocrine biomarkers in early life stages of medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology**, v.30, n.6, p.648-655, 2015a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24376129>>. Acesso em: 27 nov. 2015. DOI: 10.1002/tox.21942.

ZHU, B. et al. Assessment of trifloxystrobin uptake kinetics, developmental toxicity and mRNA expression in rare minnow embryos. **Chemosphere**, v.120, p.447-455, 2015b. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514010054>>. Acesso em: 24 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.07.100.

APÊNDICE A - SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a suficiência amostral de macroinvertebrados aquáticos bentônicos em lavouras de arroz irrigado através de outros métodos de coleta;
- Avaliar os efeitos dos agrotóxicos utilizados na lavoura de arroz irrigado sobre outras comunidades de animais, englobando a cadeia trófica desse agroecossistema;
- Avaliar os efeitos e a persistência de outros produtos fitossanitários e os metabólitos advindos da degradação dos diversos princípios ativos;
- Avaliar a genotoxicidade através de outros bioindicadores e métodos;
- Avaliar a toxicidade crônica dos princípios ativos sobre *Chironomus dilutus* ou outras espécies sensíveis.