



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Efeito dos herbicidas atrazina e clomazona sobre a
macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.)
Solms (Pontederiaceae)**

Gabriela Chavez Cossio

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Samantha Eslava Gonçalves Martins

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Marisa Hefler

Rio Grande

2021



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



**Efeito dos herbicidas atrazina e clomazona sobre a macrófita
aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae)**

Aluno: Gabriela Chavez Cossio

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Samantha Eslava Gonçalves Martins

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Marisa Hefler

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande

2021

Ficha Catalográfica

C836e Cossio, Gabriela Chavez.

Efeito dos herbicidas atrazina e clomazona sobre a macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae) / Gabriela Chavez Cossio. – 2021.
85 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Rio Grande/RS, 2021.

Orientadora: Dra. Samantha Eslava Gonçalves Martins.

Coorientadora: Dra. Sônia Marisa Hefler.

1. Pigmentos Fotossintéticos 2. Micronúcleos 3. Fitotoxicidade
4. Genotoxicidade 5. Macrófita Aquática 6. Atrazina 7. Clomazona
I. Martins, Samantha Eslava Gonçalves II. Hefler, Sônia Marisa
III. Título.

CDU 556.33

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES
AQUÁTICOS CONTINENTAIS



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES
AQUÁTICOS CONTINENTAIS – Nº 005/2021

Às 08:00 hs (oito horas) do dia 26 (vinte e seis) do mês de outubro de 2021 (dois mil e vinte e um), via Webconferência, reuniram-se docentes, discentes e comunidade em geral, para a Defesa Pública de Dissertação de Mestrado da acadêmica Gabriela Chavez Cossio. A dissertação intitulada “Efeito dos herbicidas atrazina e clomazona sobre a macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae)” foi avaliada pela Banca Examinadora composta pela Profª Dra. Samantha Eslava Gonçalves Martins (Orientadora), Prof. Dr. Junior Borella (FURG) e Profª Dra. Maria Aparecida Marin Morales (UNESP). Após a defesa e arguição pública, a Banca Examinadora reuniu-se, para deliberação final, e considerou a acadêmica **APROVADA**. Desta forma, a acadêmica concluiu mais uma das etapas necessárias para a obtenção do grau de **MESTRE EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS**. Nada mais havendo a tratar, às 11:30h (**onze horas e trinta minutos**) foi lavrada a presente ata, que lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora, pela Acadêmica e pelo Coordenador do Curso.

Profª Dra Samantha Eslava Gonçalves Martins

Profº. Dr. Junior Borella

Profª Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Gabriela
Chavez Cossio

Profº Dr. Rogério Tubino
Vianna Coordenador do
Curso

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho principalmente a Deus quem me fez chegar até aqui, a meus pais, por ser o pilar mais importante da minha vida.

A meus irmãos Alejandro, Claudia, Marco, minha cunhada Claudia Villarroel por ser uma irmã mais e a meus sobrinhos Nicole, Rafael e Sarahi por me motivar e apertar as mãos quando senti que a estrada estava terminando e, acima de tudo, por sempre me mostrar seu amor e apoio incondicional.

A minha “irmã de Brasil”, Eliza Acosta, que sempre esteve comigo, por compartilhar momentos significativos, por estar sempre disposta a me ouvir e me ajudar em qualquer momento.

Aos meus amigos Raif, Silvana, Magda, Cecilia, Beatriz pelo carinho o apoio que tiveram ao longo destes últimos anos.

*“Gratidão a vida por me dar a oportunidade
de conhecer-me a mim mesma e por permitir meu crescimento”*



AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria que estas linhas servissem para expressar meus mais profundos e sinceros agradecimentos a todas as pessoas que colaboraram na realização dessa dissertação.

Agradeço especialmente a minha orientadora Profa. Dra. Samantha Eslava Gonçalves Martins por me orientar mesmo sem me conhecer, por compartilhar o seu conhecimento comigo e por promover o desenvolvimento deste trabalho, e sobre todo por sua amizade e carinho.

Agradeço a minha co-orientadora Profa. Dra. Sônia Marisa Hefler, por ter aceitado me orientar, e por me ensinar com muita paciência e dedicação.

Gostaria de agradecer também ao Professor Cesar Costa do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal de Rio Grande - FURG, que aceitou compartilhar conosco seus conhecimentos, e pelas relevantes contribuições neste trabalho.

Agradeço ao Programa Bolsas Brasil – PAEC OEA/GCUB, pela bolsa concedida, sem a qual não seria possível a realização dessa dissertação.

Agradeço aos professores do programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais da Universidade Federal de Rio Grande - FURG, pelo conhecimento compartilhado, a paciência, carinho, e o acolhimento.

Um agradecimento às alunas da UFRG, Andressa de Souza Ávila e Jade Medeiros pelo auxílio no cultivo e testes de *E. crassipes*, às técnicas do laboratório de morfologia para fazer os cortes anatômicos das folhas e raízes, e aos técnicos do laboratório da Botânica Pablo Guimaraes e Caroline Igansi, pela orientação e por sua valiosa colaboração.

E por último um agradecimento especial a minha família e amigos, pelo apoio, compreensão e paciência, sobre todo pelo incentivo, para seguir adiante a pesar de estar longe de mim.

Para todos eles, obrigado.

RESUMO

A expansão agrícola gerou um aumento do uso de agrotóxicos nas lavouras, sendo estas atividades as que mais contaminam os ecossistemas aquáticos. Dentre eles, o herbicida atrazina e clomazona são amplamente utilizados em alguns países como o Brasil, apesar de sua proibição em diversos outros países, devido à sua toxicidade. A macrófita aquática *Eichhornia crassipes* é uma espécie não-alvo potencialmente afetada pelo uso dos herbicidas atrazina e clomazona, por responder anatômica e fisiologicamente às condições ambientais em que se desenvolve. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estrutura anatômica das raízes e folhas de *E. crassipes* submetidas a diferentes concentrações dos herbicidas atrazina e clomazona, testadas individualmente e em mistura, bem como identificar o potencial genotóxico e as possíveis alterações do metabolismo fotossintético induzidos pela atrazina, sobre essa macrófita. Propágulos clonais de *E. crassipes* foram expostos agudamente a diferentes tratamentos. Para atrazina, foi também realizado um teste de toxicidade crônico. A clomazona teve um efeito nos pigmentos fotossintéticos, onde foi observada a não formação de pigmentos carotenoides, o qual gerou um clareamento nas folhas. A atrazina afetou a biomassa das folhas e da planta, após dois dias de exposição, mas a planta foi capaz de se recuperar e até crescer na presença desse herbicida. Da mesma forma, estruturas anatômicas da folha, como epiderme adaxial (EAD), epiderme abaxial (EAB), parênquima paliádico (PP) e parênquima esponjoso (PE), apresentaram efeitos no início da exposição e se recuperaram, principalmente, ao final da exposição (14 dias). Com relação aos pigmentos fotossintéticos, os níveis de clorofila a, clorofila b e carotenoides aumentaram com o tempo, independentemente da concentração de atrazina. A incidência de micronúcleos foi o parâmetro mais afetado, mostrando que a atrazina é genotóxica para *E. crassipes*. Este estudo mostrou que os herbicidas avaliados podem induzir alterações estruturais e genotóxicas à *E. crassipes*, mas a espécie também apresenta potencial de recuperação. Os resultados reforçam que a atrazina e clomazona afetam negativamente espécies não-alvo, mesmo em concentrações ambientais relevantes, o que denota a necessidade de se estabelecer ou refinar medidas para reduzir/controlar a sua aplicação em áreas de uso autorizado.

Palavras-chave: pigmentos fotossintéticos; micronúcleos; fitotoxicidade; genotoxicidade; macrófita aquática; atrazina; clomazona.

ABSTRACT

Agricultural expansion has generated an increase in the use of pesticides in crops, which intensely contaminate aquatic ecosystems. Among them, the herbicides atrazine and clomazone are widely used in some countries such as Brazil, despite their ban due to their toxicity in several other countries. The non-target species potentially affected by the use of atrazine and clomazone, *Eichhornia crassipes*, responds anatomically and physiologically to the environmental conditions in which it develops. Therefore, the objective of this work was to assess the anatomical structure of the roots and leaves of *E. crassipes* regarding the effects of exposure to different concentrations of atrazine and clomazone individually and in mixture, as well as to identify the genotoxic potential of atrazine and the alterations they cause on the photosynthetic metabolism of *E. crassipes*. Clonal propagules of *E. crassipes* were acutely exposed to different treatments. For atrazine, a chronic toxicity test was also carried out. Clomazone had an effect on photosynthetic pigments, it was observed the non-formation of carotenoid pigments which generated bleaching in the leaves. Atrazine affected leaf and plant biomass after two days of exposure, but the plant was able to recover and even grow in the presence of this herbicide. Likewise, anatomical structures of the leaf, such as adaxial epidermis (ADE), abaxial epidermis (ABE), palisade parenchyma (PI) and spongy parenchyma (PS), showed effects at the beginning of the exposure and recovered mainly at the end of the exposure (14 days). With respect to photosynthetic pigments, the levels of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids increased with time, regardless of the atrazine concentration. The incidence of micronucleus was the most affected endpoint, showing that atrazine is genotoxic to *E. crassipes*. This study showed that *E. crassipes* is negatively affected by herbicides, but it also has recovery potential. The results reinforce that atrazine and clomazone negatively affect ecologically relevant species, even at relevant environmental concentrations, and measures to reduce/control their use need to be established or refined in areas of authorized use.

Key-words: photosynthetic pigments, micronuclei, genotoxicity, atrazine, clomazone.

APRESENTAÇÃO

A dissertação segue o modelo sugerido pelo Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), estando dividida em três principais seções. A primeira parte está composta por uma Introdução Geral, onde abordo o tema proposto por esta dissertação, as fontes poluidoras de ecossistemas aquáticos, o uso do solo, as bacias hidrográficas do estado do Rio Grande do Sul, os herbicidas atrazina e clomazona nos ambientes aquáticos, e as macrófitas aquáticas, com destaque para a estrutura anatômica, a fisiologia, as alterações estruturais anatômicas e fisiológicas de *Eichhornia crassipes*, modelo biológico utilizado neste estudo. Em seguida, são apresentados o objetivo geral, os objetivos específicos, e a hipóteses do trabalho. Os resultados são apresentados em dois capítulos. No Capítulo 1, são apresentados os resultados para o teste agudo do herbicida atrazina, clomazona, e a mistura de eles. Esta parte não está apresentada na forma de manuscrito, mas é relevante para a compreensão do Capítulo 2, que consiste em um manuscrito com os resultados do teste crônico atrazina, conduzido com a seguinte pergunta: como as folhas e raízes da macrófita aquática *E. crassipes* exposta ao herbicida atrazina responde anatômica, fisiológica e geneticamente em condições semiabertas? O manuscrito segue as normas de formatação da revista Environmental Toxicology and Chemistry (ET&C), para a qual será submetido. Em seu fechamento, a dissertação traz suas considerações finais e perspectivas futuras.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	I
AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
APRESENTAÇÃO	V
SUMÁRIO	VI
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 Fontes poluidoras	11
1.2 Uso do solo no Estado do Rio Grande do Sul (RS)	12
1.3 Bacias Hidrográficas do Estado do Rio Grande do Sul	12
1.4 Herbicidas	14
1.4.1 Atrazina (ATZ)	15
1.4.2 Atrazina em ambientes aquáticos	17
1.4.3 Clomazona	19
1.4.4 Clomazona em ambientes aquáticos	20
1.5 Macrófitas aquáticas	21
1.5.1 <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms (Pontederiaceae)	23
1.5.2 Estrutura anatômica	25
1.5.3 Estrutura fisiológica	26
1.5.4 Alterações estruturais anatômicas e fisiológicas	27
2 Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
2.3 Hipótese	29
Capítulo 1	30
1. Apresentação	31
2. Material e métodos	31
3. Resultados	33
CAPÍTULO 2	37
Abstract	39
1. <i>Introduction</i>	40
2 <i>Material and methods</i>	42

3 Results and discussion	48
4 Conclusion	60
5 Acknowledgements	61
6 References	61
Supplementary Material	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE FIGURAS

Introdução geral

Figura 1 – Processos que mobilizam as moléculas de herbicidas sem alterar a sua estrutura.

Figura 2 – Estrutura química do herbicida atrazina.

Figura 3 – Mecanismo de ação da atrazina.

Figura 4 – Estrutura química do herbicida clomazona.

Figura 5 – Formas biológicas de macrófitas aquáticas.

Figura 6 – *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms..

Toxicidade aguda dos herbicidas atrazina, clomazona e sua mistura para a macrófita *Eichhornia crassipes*

Figura 1 – (A) Índice de área foliar, (B) Biomassa da folha, e (C) Pigmentos fotossintéticos. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, e as diferenças estadísticas são apresentadas com (*), após 96 h de exposição a atrazina.

Figura 2 – (A) Índice de área foliar, (B) Biomassa da folha, e (C) Pigmentos fotossintéticos. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, e as diferenças estadísticas são apresentadas com (*), após 96 h de exposição a clomazona.

Figura 3 – Clareamento das folhas e pecíolos de *Eichhornia crassipes*, após 96 h de exposição a clomazona.

Figura 4 – (A) Índice de área foliar, (B) Biomassa da folha, e (C) Pigmentos fotossintéticos. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, e as diferenças estadísticas são apresentadas com (*), após 96 h de exposição aos herbicidas atrazina e clomazona.

Genotoxic and anatomo-physiological effects of atrazine on the aquatic macrophyte *Eichhornia crassipes* (Mart.) SOLMS

Figura 1. Número de folhas com cloroses (A) e necroses (B) após 14 dias de exposição à atrazina (n = 12). Os valores são apresentados como média $\pm$ DP as plantas foram expostas por 14 dias.

Figura 2. (A) Índice de área foliar, (B) Biomassa da folha, (C) Biomassa da planta. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, as plantas foram expostas por 14 dias seguidos de 7 dias de depuração. As letras minúsculas indicam diferenças entre as concentrações dentro do mesmo tempo de amostragem e as diferenças em letras maiúsculas entre os tempos de amostragem para a mesma concentração.

Figura 3. Concentração de (A) clorofila a, (B) clorofila b e (C) carotenoides. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, as plantas foram expostas por 14 dias seguidos de 7 dias de depuração. As letras minúsculas indicam diferenças entre as concentrações dentro do mesmo

tempo de amostragem e as diferenças em letras maiúsculas entre os tempos de amostragem para a mesma concentração.

Figura 4. Efeitos da atrazina na anatomia das folhas. (A) Epiderme adaxial (EAD), (B) Epiderme abaxial (EAB), (C) Parênquima paliádico (PP), (D) Parênquima esponjoso (PE). Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, as plantas foram expostas por 14 dias seguidos de 7 dias de depuração. As letras minúsculas indicam diferenças entre as concentrações dentro do mesmo tempo de amostragem, e as diferenças em letras maiúsculas entre os tempos de amostragem para a mesma concentração.

Figura 5. Efeitos da atrazina no índice mitótico na divisão celular meristemática da raiz. Os valores (5A) são apresentados como média $\pm$ DP, as plantas foram expostas por 14 dias seguidos de 7 dias de depuração. As letras minúsculas indicam diferenças entre as concentrações dentro do mesmo tempo de amostragem e as diferenças em letras maiúsculas entre os tempos de amostragem para a mesma concentração.

Figura 6. Células meristemáticas da raiz de *E. crassipes*, (A) célula normal, (B) Ponte anafásica com quebra cromossômica, (C) telófase irregular, (D) Divisão desorganizada, (E) Micronúcleo.

Figura 7. Incidência de células micronucleadas (MNC) após exposição à atrazina. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, as plantas foram expostas por 14 dias seguidos de 7 dias de depuração. As letras minúsculas indicam diferenças entre as concentrações dentro do mesmo tempo de amostragem e as diferenças em letras maiúsculas entre os tempos de amostragem para a mesma concentração.

LISTA DE TABELAS

Introdução geral

Tabela 1 - Características da Bacia Hidrográfica do Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira (BHPGM).

Tabela 2 - Quantidade (L) dos herbicidas mais utilizados na Bacia Hidrográfica do Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira (BHPGM).

Tabela 3 – Propriedades químicas da Atrazina.

Tabela 4. Propriedades químicas da Clomazona.

Tabela 5. Biótipos de macrófitas aquáticas.

Genotoxic and anatomo-physiological effects of atrazine on the aquatic macrophyte *Eichhornia crassipes* (MART.) SOLMS (PONTEDERIACEAE)

Tabela S1. Quantificação de atrazina.

Tabela S2. Parâmetros físico-químicos do teste de crônico atrazina.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Fontes poluidoras

A diversidade topográfica e climática da América do Sul determina a existência de uma grande variedade de ecossistemas aquáticos continentais. O desenvolvimento econômico e social de qualquer país depende da disponibilidade de água, assim como da capacidade de conservação e proteção dos ecossistemas aquáticos (VÖRÖSMARTY et al., 2000; LAGE, 2008).

Uma das causas principais do aumento no consumo de água e sua rápida deterioração, é o aumento da população, e com ela a pressão das atividades industriais, agrícolas e pecuárias sobre o meio ambiente. Neste contexto, a contaminação das águas vem tomando proporções alarmantes nos últimos tempos, já que muitos dos produtos químicos liberados no ambiente atingem os ecossistemas aquáticos (SILVA et al., 2009; COSTA et al., 2018).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021), a contaminação de rios por efluentes domésticos, industriais e resíduos sólidos tem gerado escassez de disponibilidade de água de boa qualidade, mesmo em áreas com recursos hídricos abundantes, além de aumentar os custos dos tratamentos de água para o abastecimento.

A expansão agrícola nas últimas décadas levou ao aumento do uso de agrotóxicos nas lavouras, devido a maior necessidade de proteção das plantas contra pragas agrícolas, bem como do aumento do potencial produtivo das culturas. Esse alto uso de agrotóxicos tornou as atividades agrícolas uma das maiores fontes geradoras de contaminação dos ecossistemas aquáticos (SILVA et al., 2009). Os agrotóxicos são utilizados em larga ou menor escala nas produções agrícolas, e podem ser classificados, de acordo com a suas eficiências em eliminar pragas específica, em inseticidas, fungicidas e herbicidas (BRASIL, 2020).

O Brasil é considerado umas das maiores potências no setor agropecuário do mundo, o que o coloca em primeiro lugar quando o assunto é comercialização de agrotóxicos, desde o ano 2008 (RIGOTTO et al., 2014). De acordo com a revista de Pesquisa Fapesp, a comercialização dos defensivos agrícolas no Brasil movimentava cerca de US\$ 10 bilhões por ano, o que representa 20% do mercado global, estimado em US\$ 50 bilhões (FAPESP, 2020).

O Brasil possui diversos órgãos reguladores que fundamentam e preconizam a segurança química e estabelecem parâmetros normativos, como a Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho 1989, que trata sobre o uso de agrotóxicos. Esta Lei abrange desde pesquisas,

experimentações e produção até o destino das embalagens, controle e fiscalização de agrotóxicos no país (BRASIL, 1989). Sendo regulamentada pelo Decreto nº 4.070 de 4 de janeiro de 2002, a legislação determina ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ao Ministério do Meio Ambiente (MMA) e ao Ministério da Saúde (MS), dentre outras responsabilidades, o estabelecimento do limite máximo de resíduos e o intervalo de concentração de segurança dos agrotóxicos e afins (BRASIL, 2002).

1.2 Uso do solo no Estado do Rio Grande do Sul (RS)

O Rio Grande do Sul é conhecido como um estado voltado à agricultura, onde as áreas de cultivo se estendem dos pampas à serra gaúcha, com grande diversidade de culturas, seguindo as características regionais de relevo e clima (SEVS/SES, 2010).

Segundo o Censo Agropecuário do 2017, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a utilização das terras no estado do Rio Grande do Sul está representada por 45% de pastagens (159.497,000 hectares), 29% de matas/florestas (101.370.463,000 hectares), 18% de lavouras (63.517.805,000 hectares), e 8% por outras atividades (26.904.001,000 hectares) (IBGE, 2020).

O uso de agrotóxicos no estado do Rio Grande do Sul é representado da seguinte maneira: 65% das lavouras (3.365.826 estabelecimentos) não utiliza agrotóxicos, 32% (1.681.740 estabelecimentos) utiliza agrotóxicos, e 3% (134.404 estabelecimentos) usa, mas não precisou utilizar agrotóxicos no período avaliado (IBGE, 2020).

1.3 Bacias Hidrográficas do Estado do Rio Grande do Sul

O Estado do Rio Grande do Sul é cortado por rios e córregos que compõem três Regiões Hidrográficas, com um total de 24 Bacias Hidrográficas, as quais são delimitadas por divisores da água, assim em algumas cidades estão presentes mais de uma Bacia. A atual divisão das Regiões Hidrográficas foi estabelecida pela Lei 10.350/1994 proposta pela Comissão Consultiva que subsidiava tecnicamente o Conselho de Recursos Hídricos de Estado (SEVS/SES, 2010).

A Região Hidrográfica da Bacia Litorânea está localizada na porção leste e sul do território rio-grandense e ocupa uma superfície de aproximadamente 53.356,41 km², correspondendo a 20,11% da área total do estado do Rio Grande do Sul. Compõem esta Região Hidrográfica a Laguna dos Patos e a Lagoa Mirim; algumas Bacias desta região drenam diretamente para o Oceano Atlântico: Mampituba, que é compartilhada com Santa Catarina, e

Tramandaí; para a Laguna dos Patos drenam as Bacias do Camaquã, Litoral Médio e Mirim-São Gonçalo, sendo que as duas últimas também drenam para o Oceano (SEVS/SES, 2010).

A Bacia Hidrográfica do Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira (BHPGM) (Tabela 1), situa-se no sudeste do Estado do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas geográficas de 31°30' a 34°35' de latitude Sul e 53°31' a 55°5' de longitude Oeste (SEVS/SES, 2010). Os corpos de água presentes no município de Rio Grande fazem parte desta Bacia.

Tabela 1 - Características da Bacia Hidrográfica do Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira (BHPGM).

População	671.054 hab.
Área de drenagem	20.441,69 km ²
Precipitação média anual	1.305 mm
Evaporação média anual	1.137,3 mm
Vazão média de afluência na Lagoa Mirim	787 m ³ /s ou 1.214 mm/ano.
Descarga específica média (vazão média/área)	0,038 m ³ /s/ km ² ou 38,50 l/s/km ²

Fonte: SEVS/SES (2010).

Dentre os agrotóxicos, os dez principais herbicidas mais utilizados na cultura agrícola praticada ao longo da Região Hidrográfica das Bacias Litorâneas, Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira do Estado do Rio Grande do Sul (RS), onde localiza-se o município de Rio Grande, são: glifosato, atrazina, cialotope-butilo, simazina e clomazona, (Tabela 2) (SEVS/SES, 2010; CAPOANE et al., 2015; FRANCALOSS, 2019; IBGE, 2020).

Tabela 2 - Quantidade (em litros) dos herbicidas mais utilizados na Bacia Hidrográfica do Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira (BHPGM).

Herbicidas	Quantidade (L)
Glifosato	578.735,4
Atrazina	46.351,5
Cialotope-butilo	38.148,9
Simazina	32.901,7
Clomazona	30.896,3

Fonte: SEVS/SES (2010).

Os agrotóxicos são compostos químicos que trazem uma grande preocupação na questão ambiental, pois muitos deles são persistentes no ambiente e podem afetar a saúde do homem, a qualidade dos solos e das águas, entre outros problemas. A contaminação ambiental por agrotóxicos é derivada, principalmente, do uso intensivo e inadequado dos mesmos (SEVS/SES, 2010).

1.4 Herbicidas

A intensificação da agricultura e a substituição do sistema de preparo convencional pelo plantio direto, no qual o controle de plantas invasoras é exclusivamente químico, tem promovido um aumento na necessidade de aplicação de diversos herbicidas (CANDELA, 2016).

Os herbicidas são compostos que apresentam atividades biológicas reconhecidas, por isso muito usados para controlar espécies invasoras de cultura, se caracterizando, portanto, em uma importante estratégia para garantir a produção de alimentos. Esses produtos são classificados de acordo com suas características, permitindo estabelecer grupos afins com base na seletividade de sua ação, época de aplicação, translocação, estrutura química e o mecanismo de ação (STEPHENSON et al., 2006).

As plantas invasoras competem com a cultura pela luz, umidade e nutrientes, além de apresentarem rusticidade, resistência a pragas/doenças e maior habilidade de produzir grande quantidade de sementes, o que lhe confere um alto potencial de disseminação na cultura. Devido a estas características apresentam maior resistência e habilidade para se reproduzir que a cultura desejada, sendo necessário o seu controle (OLIVEIRA et al., 2011).

A maioria das culturas implantadas exige a utilização de defensivos agrícolas, usados na preparação da terra ou durante o desenvolvimento das plantas. A toxicidade dos herbicidas pode não ficar restrita apenas aos locais onde são aplicados, mas podem ser introduzidos nos ecossistemas aquáticos durante sua aplicação, por pulverização aérea, pelo escoamento superficial das águas de chuva advindas da agricultura e por infiltração, contaminando inclusive águas de captação para o abastecimento humano (Figura 1) (PEREIRA, 2012; EMBRAPA, 2018).

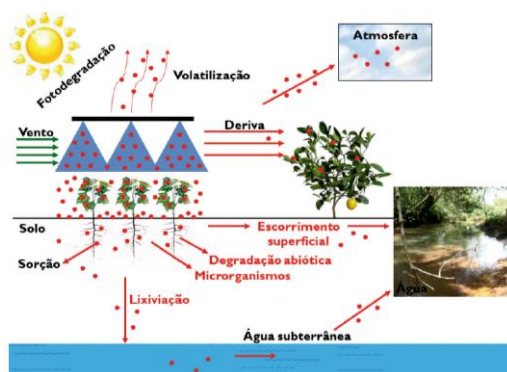


Figura 1 – Processos que mobilizam as moléculas de herbicidas sem alterar a sua estrutura. Fonte: Embrapa (2018).

Quando os herbicidas atingem os ecossistemas de água doce, eles interagem tanto com os componentes abióticos como com os bióticos do local. Embora os fatores abióticos e os microrganismos possam promover a degradação desses compostos, a interação com componentes bióticos pode desencadear efeitos danosos à comunidade aquática (KONSTANTINO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2020).

Nos ecossistemas aquáticos, os herbicidas não são encontrados isolados, mas sim combinados entre si ou com outros componentes do sistema. Os testes realizados com combinações de diferentes agrotóxicos fornecem informações adicionais àquelas obtidas em testes realizados com agrotóxicos individualizados, como por exemplo, os potenciais efeitos aditivos (a toxicidade final é igual à soma dos efeitos produzidos pelos compostos presentes na mistura, em testes separados), antagônicos (a presença de um composto tóxico diminui a toxicidade de outro, produzindo uma toxicidade total menor), sinérgicos (a toxicidade final é maior do que a soma das toxicidades obtida em testes individuais), ou potencializador (o efeito de um dos compostos tóxicos aumenta por interferência do outro agente tóxico presente na mistura, que, inicialmente, não apresentava efeito tóxico) (CRUZ, 2013).

1.4.1 Herbicida atrazina (ATZ)

A atrazina [2-cloro-4- (etilamino) -6- (isopropilamino) -s- triazina] é um herbicida seletivo pertencente à família das triazinas, que contém em sua estrutura química um anel aromático hexamérico e simétrico constituído por três carbonos e três átomos de nitrogênio em posições alternadas (Figura 2) (SENE et al., 2010).

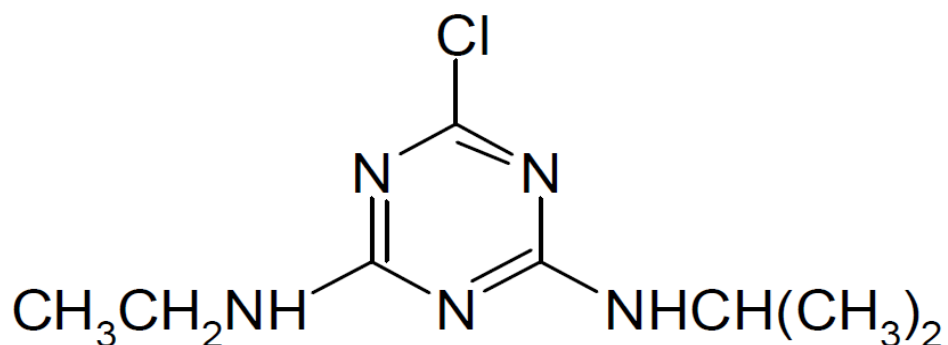


Figura 2 – Estrutura química do herbicida atrazina. Fonte: SENE, et al., (2010).

O herbicida atrazina é considerado um poluente potencial, devido às suas propriedades físico-químicas: alta solubilidade e mobilidade; persistência moderada; meia-vida de vários dias a meses, dependendo das características do solo e as práticas agrícolas utilizadas (Tabela 3) (FUENTES et al., 2003).

Tabela 3 – Propriedades químicas da Atrazina.

Propriedade	Valor	Fonte
Solubilidade em água a 20°C (mg L ⁻¹)	35	IUPAC, 2018
Peso Molecular (g mol ⁻¹)	215,6	IUPAC, 2018
Meia vida na água (hidrólise)	20 - 100 dias, 20°C, pH 7	IUPAC, 2018
Coefficiente de partição octanol-água (log K _{ow}) a 20°C, pH 7.	2,7	IUPAC, 2018
Coefficiente de adsorção ao carbono orgânico do solo (K _{oc})	100	IUPAC, 2018

Esse herbicida é utilizado para controlar plantas invasoras, tanto de folhas largas quanto gramíneas (Eudicotiledoneas e das famílias das Poaceae), impedindo o crescimento das mesmas, por vários meses. O herbicida atrazina, quando aplicado na pré-emergência, é absorvido pelo sistema radicular da planta, mas na pós-emergência a absorção se dá diretamente pelas folhas. Neste último caso, ocorre uma rápida penetração nos cloroplastos, que leva a clorose, necrose e morte da planta. O herbicida é utilizado especialmente em plantações de milho, sorgo, cana-de-açúcar e no plantio de reflorestamento de coníferas (RIBEIRO et al., 2020).

A ação da atrazina é sistêmica e residual. O herbicida é aplicado no solo para controle de plantas invasoras, principalmente, durante a sua germinação. Ao ser absorvido por essas plantas, transloca-se em direção basipeto e acrópeto, pelo xilema, atingindo outras áreas da planta onde exerce sua ação, como nos meristemas apicais e nas folhas, impedindo a fotossíntese e outros processos enzimáticos (CANDELA, 2016).

A atrazina tem um mecanismo de ação que é exclusivo para plantas, portanto, sua toxicidade tende a ser maior em plantas que em animais (SOLOMON et al., 2008). Esse herbicida inibe a fotossíntese, pelo bloqueio do transporte de elétrons no fotossistema II (Figura 3), que ocorre pelo fato da molécula de atrazina se ligar ao receptor da plastoquinona QB (aceptor de elétrons), interrompendo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas. Com a inibição, os elétrons não são convertidos em energia química (ATP - adenosina trifosfato), NADPH

(nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e impõem uma alta carga de energia nas moléculas de clorofila, levando a peroxidação lipídica nas membranas, redução do estoque de carbono e o acúmulo de dióxido de carbono nas células vegetais (MARCHI et al., 2008; ALBUQUERQUE, et al., 2019).

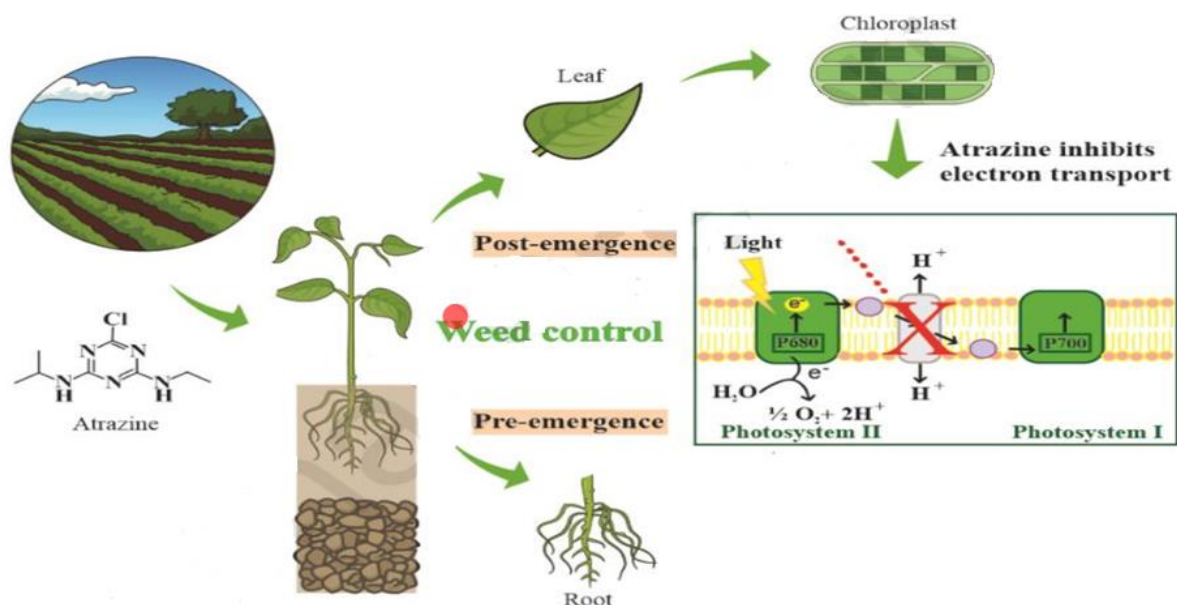


Figura 3 – Mecanismo de ação da atrazina. Fonte: ALBUQUERQUE et al., (2019).

1.4.2 Atrazina em ambientes aquáticos

A atrazina foi introduzida na década de 1950 e logo adquiriu o status de herbicida mais usado mundialmente, sendo muitas vezes aplicado em combinação com outros herbicidas. Caracterizado por sua abrangente aplicação e alta persistência, atrazina é frequentemente detectada em ecossistemas aquáticos, onde sua presença afeta a reprodução da fauna e flora aquática, interferindo na estrutura das comunidades (CHAN; CHU, 2005). A degradação da atrazina na água ocorre em menor grau e mais lentamente do que no solo, daí a importância de evitar que esse produto chegue às águas superficiais e subterrâneas (GUILLEN et al., 2007).

No Brasil, a ATZ é utilizada nas culturas de milho, sorgo e cana-de-açúcar, e alguns estudos de monitoramento indicam sua presença em mananciais (BORTOLUZZI et al., 2006). Estudos da Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul mostram que a atrazina é aplicada na Bacia Hidrográfica Litorânea do Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira, no estado do Rio Grande do Sul (RS), em uma quantidade de 46.351,5 L/ano, tanto em culturas de inverno como de verão (SEVS/SES, 2010).

O composto é classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como classe III de toxicidade, na qual se enquadram os compostos moderadamente tóxicos. A fim de proteger a saúde humana e a vida aquática, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) recomenda um nível máximo para a atrazina de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais (COELHO, 2012; HANSEN et al., 2013; MOREIRA et al., 2014).

Nos Estados Unidos e na Europa, a atrazina, hoje proibida, era encontrada em ecossistemas aquáticos em concentrações de $2,9$ a $89,9 \mu\text{g L}^{-1}$ (CEREJEIRA et al., 2003). No Brasil, esse herbicida é encontrado na Sub-bacia do Rio Corumbataí, Bacia do rio Piracicaba do Estado de São Paulo, em concentrações que variam entre $0,6$ e $2,7 \mu\text{g L}^{-1}$, durante o verão chuvoso, com concentrações no rio Corumbataí ligeiramente acima do nível máximo permitido por lei em corpos de água brasileiros (ARMAS et al., 2007; MOREIRA et al., 2014). Na Bacia Hidrográfica Litorânea do Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira, estudos preliminares determinaram a presença de atrazina em corpos de águas superficiais na Estação Ecológica do Taim, em concentrações de $0,005$ a $0,028 \mu\text{g L}^{-1}$ (CALDAS et al., em preparação).

Estudos realizados com atrazina demonstraram que este agrotóxico induz efeitos nos sistemas neuroendócrino e reprodutivo e apresenta potencial carcinogênico. Além de ser um inibidor da fotossíntese e do hormônio de crescimento, o que pode afetar a cadeia trófica dos corpos hídricos (GIBSON et al., 2008). Os efeitos tóxicos agudos da atrazina permitem a seguinte ordenação de táxons em um sentido decrescente de sensibilidade: 1º) fitoplâncton, 2º) macrófitas, 3º) bentos, 4º) zooplâncton e 5º) peixes (SOLOMON et al., 2008). Estudos realizados com este herbicida mostraram que a atrazina afetou a biomassa da macrófita aquática *Lemna gibba* ($\text{CE}_{50} = 0,019 \text{ mg L}^{-1}$), após 7 dias (IUPAC, 2018); inibiu o crescimento da alga *Raphidocelis subcapitata* ($\text{CL}_{50} = 0,196 \text{ mg L}^{-1}$), após 72 horas de exposição (PÉREZ et al., 2011); inibiu a luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* ($\text{CL}_{50} = 69,4 \text{ mg L}^{-1}$) (PALMA et al., 2008); foi tóxica para duas espécies de cladóceros que ocorrem naturalmente nos corpos de água do Brasil, a *Ceriodaphnia silvestrii* ($\text{CE}_{50} = 14,30 \text{ mg L}^{-1}$) e *Macrothrix flabelligera* ($\text{CE}_{50} = 12,37 \text{ mg L}^{-1}$) (MOREIRA et al., 2014); induziu mortalidade em cladocera *Pseudosida ramosa* ($\text{CL}_{50} = 17,1 \text{ mg L}^{-1}$) (FREITAS et al., 2011), em anostraca *Thamnocephalus platyurus* ($\text{CL}_{50} = 36,7 \text{ mg L}^{-1}$) (PALMA et al., 2008), em anfíbio *Rana catesbeiana* ($\text{CL}_{50} = 18,9 \text{ mg L}^{-1}$) (TAYLOR et al., 1991), e peixe *Oncorhynchus kisutch* ($\text{CL}_{50} = 48,0 \text{ mg L}^{-1}$) (WAN et al., 2006). No entanto, cabe destacar que nos estudos acima mencionados, a toxicidade foi demonstrada em concentrações bem acima das encontradas em ambientes naturais.

1.4.3 Clomazona

O herbicida clomazona (2-[(2-clorobenzil)] -4, 4-dimetil-1, 2-oxazolidin-3-ona) pertence ao grupo químico isoxazolidinona (Figura 4), sendo classificado como moderadamente tóxico (Classe III). Esse herbicida tem alta eficiência no controle de gramíneas anuais e plantas invasoras de folha larga, e é o terceiro herbicida mais usado nas culturas de arroz, algodão, ervilha abóbora, soja, batata doce, tabaco, trigo e uma variedade de hortaliças na metade do sul do Brasil (NOLDIN et al., 2001; ANVISA, 2020).

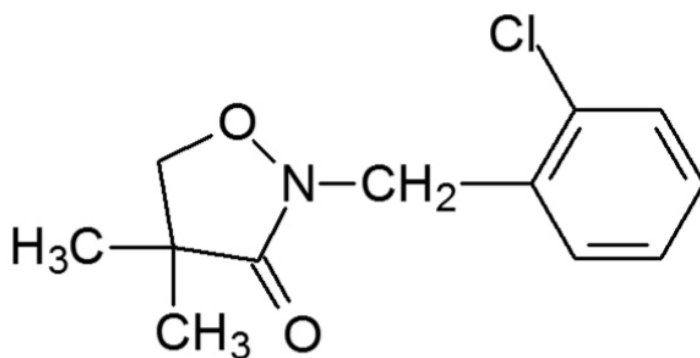


Figura 4 – Estrutura química do herbicida clomazona. Fonte: PRIMEL et al. (2005).

As propriedades físico químicas do herbicida clomazona (Tabela 4) o indicam como um contaminante em potencial de águas superficiais e subterrâneas, por ser transportado na forma dissolvida em água, sendo conhecido como uma ameaça potencial ao ecossistema aquático (CALDAS, 2009; MARCHESAN et al., 2010; VAN SCOY; TJEERDEMA, 2014). Além disso, o monitoramento do herbicida clomazona em amostras de água revelou que este químico persiste na água por pelo menos 130 dias, estando presente em 90% das amostras de água de rio analisadas no Brasil (ZANELLA et al., 2008). Em outro exemplo, o herbicida clomazona foi detectado em mais de 50% das amostras de água potável, avaliada em monitoramentos realizados por quatro anos consecutivos na região sul do Brasil (CALDAS et al., 2009).

Tabela 4. Propriedades químicas da Clomazona.

Propriedade	Valor	Fonte
Solubilidade em água a 20°C (mg L ⁻¹)	1.212	IUPAC, 2018

Peso Molecular (g mol^{-1})	239,70	IUPAC, 2018
Meia vida na água (hidrólise)	130 dias pH > 6,5 Estável, pH 7,0, 20°C	IUPAC, 2018
Coeficiente de partição octanol-água (log Kow) a 20°C, pH 7.	2,5	IUPAC, 2018

O herbicida clomazona é utilizado nas lavouras em controles pré e pós-emergente de plantas invasoras. O herbicida é absorvido principalmente pelas raízes e ápices dos caules, translocado-se através do xilema para as folhas. Clomazona atua diretamente no processo fotossintético da planta, prejudicando a formação de pigmentos fotossintéticos na via biosintética dos carotenoides (PEREIRA, 2012). A não formação de pigmentos carotenoides gera clareamento no tecido jovem em desenvolvimento, levando um branqueamento nas plantas sensíveis a ele. A ausência de carotenoides implica que a proteção que estes fornecem à clorofila contra a fotoxidação da luz solar seja cancelada, o que faz com que a clorofila formada se degrade rapidamente na presença de luz, seguida por peroxidação lipídica da membrana que causa a destruição parcial da membrana celular (TENBROOK et al., 2005; VAN SCOY; TJEERDEMA, 2014).

1.4.4 Clomazona em ambientes aquáticos

O herbicida clomazona é bastante utilizado no Rio Grande do Sul, principalmente na cultura de arroz irrigado. A proximidade destas culturas em relação aos cursos de água e o volume de água utilizado na irrigação são aspectos importantes que, associados a precipitação pluvial, favorecem o transporte do herbicida das lavouras de arroz irrigado para os mananciais hídricos (MARCHESAN et al., 2007; COSTA et al., 2008; MARCHESAN et al., 2010).

No Brasil, a Resolução CONAMA 357/2005 estabelece os limites máximos permissíveis dos parâmetros de qualidade da água superficiais e subterrâneas, para garantir a proteção ambiental, no entanto a emissão da clomazona em corpos hídricos não é regulamentada. Nos Estados Unidos, a concentração máxima permitida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.EPA) é $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas superficiais (DELLAMATRICE et al., 2014).

No Rio Grande do Sul, estudos de monitoramento de agrotóxicos na Bacia Hidrográfica Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira, apontam que é utilizado um volume de 25.878,295 L/ano de clomazona em culturas de inverno e verão (SEVS/SES, 2010). Outros estudos do monitoramento realizados no Brasil determinaram a presença da clomazona, nos rios Vacacaí

e Vacacaí-Mirim do Rio Grande do Sul, Brasil, em concentrações variando, respectivamente, de 0,8 a 4,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 0,9 a 3,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CARLOMAGNO, 2013). Na Estação Ecológica do Taim, dados preliminares indicam a presença de clomazona em concentrações entre 0,007 e 0,075 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Estudos ecotoxicológicos realizados com clomazona demonstraram que o agrotóxico causou dano agudo (CE50) em macrófita aquática *Lemna gibba* (34,0 mg L^{-1}) (IUPAC, 2019); afetou o crescimento da alga *Navicula pelliculosa* (CE50 = 0,136 mg L^{-1} ; NOEC = 0,05 mg L^{-1}) (IUPAC, 2018); causou dano agudo e crônico em *Daphnia magna* (CE50 = 2,2 mg L^{-1} ; CENO = 12,7 mg L^{-1}) (IUPAC, 2019) e nos peixes neotropicais *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) e *Leporinus obtusidens* (Anostomidae) (CL50), em concentrações entre 3,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 4,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MIRON et al., 2005).

1.5 Macrófitas aquáticas

As macrófitas aquáticas são formas macroscópicas de vegetação aquática (WETZEL, 1993), classificados quanto ao seu biótipo (Tabela 5), principalmente em função do grau de adaptação ao meio aquático (THOMAZ; ESTEVES, 2001). Apresentam uma grande amplitude ecológica e capacidade de adaptação, sendo encontradas nas margens e nas áreas rasas de rios, lagos, cachoeiras, em água doce, salgada e salobra (ESTEVES, 1988).

Tabela 5. Biótipos de macrófitas aquáticas.

Tipos biológicos	Definição	Exemplos
Emersas	Plantas enraizadas no sedimento apresentando as folhas acima da lâmina de água.	<i>Echinochloa</i> , <i>Typha</i>
Flutuantes livres	Plantas que se desenvolvem flutuando livremente no espelho de água.	<i>Eichhornia</i> , <i>Lemna</i> , <i>Limnobium</i>
Submersas enraizadas	Plantas enraizadas crescendo submersas.	<i>Vallisneria</i> , <i>Nitella</i>
Submersas livres	Plantas que apresentam raízes pouco desenvolvidas, flutuando submersas em águas lânticas, presas a outras estruturas de outras plantas aquáticas.	<i>Utricularia</i>
Com folhas flutuantes	Plantas enraizadas desenvolvendo-se com folhas flutuando na lâmina de água.	<i>Nymphaea</i> , <i>Nymphoides</i>

Fonte: THOMAZ; ESTEVES (2001).

A distinção das macrófitas aquáticas em diferentes grupos reflete a distribuição organizada e paralela à margem (Figura 5), permitindo observar um gradiente de distribuição da margem para o interior do corpo hídrico (ESTEVES, 1988; PEDRALLI, 1990; THOMAZ; ESTEVES, 2001; BINI et al., 2001; TRINDADE et al., 2010).

No Brasil, a classificação comumente aceita para macrófitas, refere-se a: **1) Macrófitas aquáticas submersas enraizadas ou fixas**, são enraizadas e crescem totalmente submersas na água, normalmente emitem as estruturas reprodutivas acima do nível de água; **2) Macrófitas aquáticas submersas livres**, permanecem flutuando submersas na água, geralmente prende-se a pecíolos e caules de outras macrófitas; **3) Macrófitas aquáticas com folhas flutuantes ou flutuantes fixas**, são enraizadas e com folhas flutuando na superfície da água; **4) Macrófitas aquáticas flutuantes livres**, permanecem flutuando com as raízes abaixo do nível da superfície da água; **5) Macrófitas aquáticas emergentes ou emersas**, enraizadas, porém com folhas podendo alcançar grande altura acima do nível de água; **6) Anfíbias**, encontradas na interface água-terra, tolerantes à seca; e **7) Epífitas**, espécies que se estabelecem e se desenvolvem sobre indivíduos de espécies flutuantes livres ou fixas (BINI et al., 2001; TRINDADE et al., 2010).

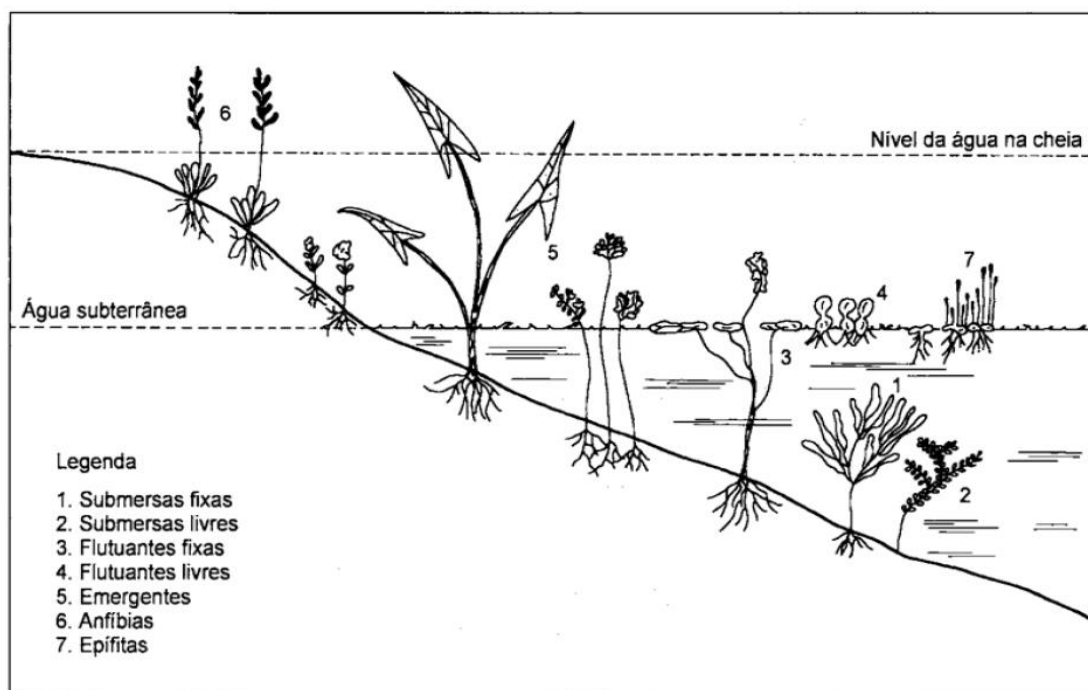


Figura 5 – Anatomia e distribuição estratificada das macrófitas aquáticas. Fonte: PEDRALLI (1990).

As macrófitas aquáticas exercem um papel vital nos ecossistemas aquáticos como produtores primários, fornecendo alimento e habitat para organismos aquáticos e terrestres (ROLON; MALTCHIK, 2006). Neste contexto, constituem uma das principais comunidades dos ecossistemas aquáticos, por contribuírem para a diversidade biológica e por apresentarem uma elevada biomassa e alta produtividade, desempenhando importante papel no ciclo de nutrientes e fluxo de energia do ecossistema (ESTEVES, 1988). As macrófitas também são importantes para os organismos aquáticos, por servirem de abrigo para animais nectônicos e bentônicos, assim como também de refúgio para pequenos animais em fuga dos grandes predadores (BRUM et al., 2001; ALBERTONI; SILVA; VEIGA, 2005; TRINDADE et al., 2010).

Entre os diversos papéis desempenhados pelas macrófitas aquáticas, destacam-se: seu importante papel trófico, por apresentarem altos conteúdos de proteínas e carboidratos solúveis e uma reduzida fração de parede celular (SILVA; CAMARGO, 2002); atuam como armazenadoras de nutrientes, influenciando as características físico-químicas dos corpos de água (PAGIORO; THOMAZ, 1999); e servem de hospedeiras para as associações com algas perifíticas e bactérias (ESTEVES, 1988).

1.5.1 *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae)

E. crassipes (Mart) Solms (Figura 6) é uma macrófita aquática flutuante perene, nativa da América do Sul, monocotiledônea pertencente à ordem Commelinales, família Pontederiaceae (Stevens, 2017), que apresenta características como: folhas pecioladas rígidas e brilhantes, com cutícula espessa e repelente a água; bainha larga que envolve o caule na base; formato sagitado ou ovalado com pecíolo inflado; flores sésseis em inflorescências tipo racemo simples, espiciforme (POMPÊO, 2017). As raízes são numerosas e com coifa bem desenvolvida. A estrutura de *E. crassipes* tem uma relação linear com a biomassa da planta e com o comprimento do pecíolo (COAN et al., 2002).



Figura 6 – *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms.

A planta de *E. crassipes* apresenta uma grande capacidade de adaptação e grande amplitude ecológica, coloniza os mais diferentes tipos de ambientes, tem uma ampla distribuição geográfica, sendo considerada uma planta cosmopolita (TRINDADE et al., 2010; SOUSA, 2014). Se adapta melhor em águas mais profundas, a estrutura da planta depende das folhas como flutuadores (pseudobulbos de aerênquima), se desenvolve rapidamente em ambientes sujeitos aos mais variados tipos de estresse e de pressões e tem uma proliferação extremamente rápida em condições de alta temperatura e umidade (POTT; POTT, 2000; PEREIRA, 2010; REZANIA, 2015).

E. crassipes tornou-se um elemento de importância, do ponto de vista da fitoremediação, por ter um alto potencial para capturar herbicidas, metais e metalóides, como arsênio, cádmio, cromo, mercúrio, e outras toxinas, em decorrência da sua capacidade de remover, degradar ou isolar substâncias tóxicas de solos e de ecossistemas aquáticos (HURTADO et al., 2010). São também utilizadas como ‘agentes purificadores’, o que justifica-se pela intensa absorção de nutrientes e pelo seu rápido crescimento (LIMA, 2005, FREITAS et al., 2009). Por outro lado, pouco se sabe sobre os efeitos deletérios das substâncias tóxicas para esta espécie.

Além da importância ecológica, *E. crassipes* é ainda utilizada para diferentes fins, como: produção de álcool; biofertilizante e forragem em sistemas agrícolas; ração animal; produção de biogás; planta ornamental; tem potencial para confecção de seda sintética (rayon) e é usada na Índia para fabricação de papel e papelão; a inflorescência nova e o broto tenro são ainda usados como alimento humano; e o amido tem potencial para biscoitos, bolos, etc. (POTT; POTT, 2000; BUSTAMANTE, 2010).

1.5.2 Estrutura anatômica

A anatomia vegetal é uma área da botânica que estuda a estrutura dos órgãos vegetais, incluindo neste estudo as modificações que ocorrem na estrutura interna da planta, em função das pressões ambientais. Tais estudos possibilitam avaliar a adaptação dos organismo a uma dada condição ambiental e a sensibilidade das plantas frente a um estressor (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

As lesões externas das plantas são aquelas visíveis ao olho nu e se destacam como o método mais utilizado para avaliar a sensibilidade das espécies vegetais a diversos fatores de estresse. No entanto, uma avaliação mais robusta requer uma investigação microscópica, pois essas análises são essenciais para a obtenção de um diagnóstico precoce de danos, passíveis então de serem estimados antes mesmos de serem evidenciados no corpo externo da planta (SANTOS; AZEVEDO, 2007; BARBOSA et al., 2009).

Em função da pressão ambiental, os tecidos foliares podem apresentar modificações na espessura e proporção, podendo modificar características como: a espessura da cutícula, da epiderme, do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso, aerênquima, entre outras. As modificações ocorrem em função de estresses como, intensidade de radiação, estresse hídrico e exposição a substâncias tóxicas (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; GRISI et al., 2008; LARVAS, 2010).

As folhas de *E. crassipes* são classificadas como de limbo simples, orbicular (mais ou menos circular), paralelinérveas (nervuras paralelas) e com filotaxia alterna (uma folha por nó). Pelo tamanho e a ramificação do pecíolo, a planta é chamada de longipecioladas (por terem o pecíolo maior ou igual ao comprimento da lâmina foliar) e simples, respectivamente. Devido a sua consistência quebradiça, são folhas consideradas cartáceas e, por possuírem uma única cor (verde), são concolores. Além disso, possuem ápice circular, base obtusa, margem inteira e superfície lisa (COAN et al., 2002).

A estrutura anatômica da folha possui as seguintes características: uma cutícula delgada brilhante, a qual favorece a reflexão da luz incidente cuja função é de proteção; uma epiderme de células longas (característica de plantas aquáticas); estômatos na superfície adaxial da folha, cuja função é regular as trocas gasosas e transpiração; um parênquima paliçádico, cujas células cilíndricas estão dispostas perpendicularmente à epiderme; um parênquima esponjoso, cujas células são de formato irregular, se dispõem de maneira a deixar numerosos espaços intercelulares; ambos parênquimas são muito importantes para a planta nos processos de

fotossíntese, cicatrização, armazenamento de substâncias, secreção e transporte; um aerênquima, tecido parenquimatoso caracterizado pela presença de grandes espaços intercelulares, cuja função principal é auxiliar na troca de gases. Os feixes vasculares imersos no parênquima são envolvidos por uma bainha parenquimática incolor composto de floema voltado para a epiderme adaxial, e de xilema voltado para a epiderme abaxial (APPEZZATO; GUERREIRO, 2006; PEREIRA, 2010; RAVEN et al., 2014).

As raízes também respondem a mudanças ambientais, pois ficam em contato direto com a água, assimilando as substâncias tóxicas presentes no ambiente, podendo ser utilizadas para a avaliação da genotoxicidade e/ou mutagenicidade ambiental, utilizando as alterações cromossômicas e anormalidades ao longo da divisão das células meristemáticas das raízes (Interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) como indicadores (MATIOLLI, 2014).

Estudos citotóxicos com plantas mostraram alterações no DNA, afetando assim o aumento e diminuição da proliferação celular das pontas das raízes, ocasionando dano ao material genético como o aparecimento de micronúcleos (GROVER; KAUR, 1999; MATIOLLI, 2014). Os micronúcleos são corpos citoplasmáticos constituídos de cromatina, formados por fragmentos cromossômicos acêntricos que se perderam durante a anáfase e não se reincorporaram aos núcleos das células filhas no processo de divisão celular (OBIAKOR et al., 2012; BHAT; WANI, 2017). Os MN podem ainda ser derivados de perdas cromossômicas e de amplificação gênicas. Os MN derivados de fragmentos cromossômicos são decorrentes de ação clastogênicas de um agente estressor, enquanto que derivados de perdas cromossômicas e de amplificações gênicas são decorrentes de ação aneugênicas do agente estressor e os outros dois, por ação aneugênica (LEME E MARIN -MORALES, 2009; FERNANDES ET AL, 2007, 2009).

1.5.3 Estrutura fisiológica

As macrófitas aquáticas respondem anatômica e fisiologicamente as condições ambientais em que se desenvolvem. Essas condições podem influenciar nas características primárias, como o crescimento e o desenvolvimento da planta, na produção de estruturas secundárias e na quantidade de pigmentos. De maneira geral, as macrófitas aquáticas submetidas a qualquer tipo de estresse tendem a perder a capacidade fotossintética e diminuir o teor de clorofila de suas folhas (CARTER; KNAPP, 2001; SALISBURY; ROSS, 2012; JARAMILLO et al., 2018).

A clorofila é um dos principais indicadores da capacidade fotossintética das plantas e a quantificação dos pigmentos fotossintéticos contribui para determinar o comportamento das plantas durante seu ciclo de desenvolvimento na presença de contaminantes (CRUZ et al., 2009). A clorofila a é o pigmento principal da fotossíntese, considerado como um pigmento ativo cuja função é transformar a energia luminosa em energia química, para que seja utilizada no crescimento das plantas (CAMBRÓN et al., 2011). A clorofila b absorve luz em comprimentos de onda diferentes da clorofila a, assim, a luz é transferida para a clorofila a, que a transforma em energia. Portanto, a clorofila b é considerada um pigmento acessório e faz parte das antenas coletoras (grupo de várias centenas de pigmentos, entre eles, clorofilas e carotenoides) (CAMBRÓN et al., 2011; JARAMILLO et al., 2018). Os carotenoides tem função antioxidante e também atuam como pigmentos acessórios da fotossíntese, quando as plantas são submetidas a condições de estresse. Nessas condições, a relação carotenos/clorofila total aumenta, como reflexo de uma maior síntese de carotenos do que clorofilas, com o objetivo de proteger os tecidos contra o estresse (AVILA et al., 2012; JARAMILLO et al., 2018).

1.5.4 Alterações estruturais anatômicas e fisiológicas

A anatomia das plantas, quando sob pressões ambientais (estresse hídrico e presença de substâncias tóxicas), pode se adaptar ou se tornar sensível. Os tecidos foliares podem exibir modificações na espessura e proporção, podendo apresentar modificações, por exemplo, na espessura da epiderme, da cutícula, do parênquima paliçádico, no número e tamanho dos estômatos, além de modificações nos tecidos vasculares (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; DHIR et al., 2011; DHIR et al., 2013; PEREIRA, 2012).

Estudos realizados com *E. crassipes* submetida a estresse por despejos de uma indústria têxtil, mostraram uma significativa redução do crescimento e tamanho das células das plantas, supostamente devido as condições estressantes do meio, por este conter metais traço e outros materiais tóxicos (MAHMOOD et al., 2005).

Lage (2008) mostrou que os metais Cd, Pb e Sr podem ser complexados aos cristais de ráfide (oxalato de cálcio) e acumulados no parênquima das células das raízes, rizoma, pecíolo e folhas de *E. crassipes*, impedindo que um dano maior seja causado às plantas, reações estas que, de acordo com Mazen; e Maghraby (1998), conferem uma tolerância da planta a estes metais (MAZEN; MAGHRABY, 1998). No entanto, condições extremas de estresse causado por metais pesados podem afetar os processos realizados nos tilacóide e o conteúdo de clorofila,

interferindo na eficiência da fotossíntese e inativando o FSII e a cadeia de transporte de elétrons que daria origem ao ATP e NADPH₂ (PÄTSINKKÄ et al., 2002).

As variações no conteúdo total de clorofila e de carotenoides são bons indicadores de estresse em plantas superiores. Mishra et al. (2007) afirmam que plantas de *E. crassipes*, intoxicadas com Cd, diminuíram o conteúdo de clorofilas a e b, e de clorofilas totais, a medida em que as concentrações de Cd foram aumentando.

O estresse ambiental também pode gerar diferentes reações no metabolismo das plantas, causando disfunções que podem influenciar nas características fisiológicas, como o crescimento e desenvolvimento e afetando a fotossíntese. Estudos com metais pesados avaliaram a diminuição dos níveis da fotoquímica do fotossistema (FSII), com o rendimento da fluorescência da clorofila a, o qual revela o nível de excitação da energia no sistema de pigmentos (HECKATHORN et al., 2004).

Apesar dos vários trabalhos descreverem as alterações estruturais de *E. crassipes* frente a presença de poluentes em ambientes aquáticos (PÄTSINKKÄ et al., 2002; MAHMOOD et al., 2005; LAGE, 2008; CASTRO et al., 2009; PEREIRA, 2010; MATIOLLI, 2014), pouco se conhece sobre os efeitos dos herbicidas atrazina e clomazona sobre as estruturas anatômicas e fisiológicas de *E. crassipes* (LANGE, 2008; PEREIRA, 2010).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Em função do exposto acima, o objetivo central do presente estudo foi avaliar a estrutura anatômica das raízes e folhas de *E. crassipes*, submetidas a diferentes concentrações dos herbicidas atrazina e clomazona, individualmente e em mistura, bem como identificar o potencial genotóxico da atrazina e alterações que esta causam sobre o metabolismo fotossintético de *Eichhornia crassipes*.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Verificar se os herbicidas atrazina e clomazona, em exposições individuais ou em mistura, apresentam toxicidade e efeitos subletais agudos em *E. crassipes*, a partir da análise de mortalidade, alterações morfológicas (células e tecidos) e dos níveis de clorofila e carotenoides;

- ❖ Identificar e caracterizar células e tecidos de folhas e raízes de *E. crassipes*, após exposição crônica a diferentes concentrações de atrazina.
- ❖ Identificar danos genotóxicos em células meristemáticas de raízes de *E. crassipes* através de análise de micronúcleos e outras anormalidades nucleares, após exposição a atrazina.

2.3 Hipótese

Os herbicidas atrazina, clomazona, bem como a mistura deles, afetam as funções metabólicas de células de folhas e raízes de *E. crassipes*, promovendo alterações morfológicas nesses tecidos vegetais.

Capítulo 1

Toxicidade aguda dos herbicidas atrazina e clomazona, bem como de sua mistura, para a macrófita *Eichhornia crassipes*

1. Apresentação

Para atender ao objetivo específico 1 desta dissertação: “Verificar se os herbicidas atrazina e clomazona, em exposições individuais ou em mistura, apresentam toxicidade e efeitos subletais agudos em *E. crassipes*, a partir da análise de mortalidade, alterações morfológicas (células e tecidos), dos níveis de clorofila e carotenoides”, foram realizados testes de toxicidade aguda da atrazina do clomazona, bem como de misturas dos dois herbicidas. O desenho experimental e os resultados estão apresentados, de forma resumida, neste capítulo.

2. Material e métodos

2.1 Coleta e cultivo de *Eichhornia crassipes*

Plantas adultas de *E. crassipes* foram coletadas em outubro de 2019 na Estação Ecológica do Taim (32 ° 50'S, 52 ° 26'W), uma reserva natural restrita inserida nos municípios de Rio Grande e Santa Vitória do Palmar, no sul do Brasil. A coleta foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade do Brasil (ICMBio; autorização SISBIO 60291-3). As plantas foram levadas para uma estufa sem aquecimento, localizada no Instituto de Oceanografia da FURG (Rio Grande, RS, Brasil), onde foram cultivadas em caixas d'água de 300 L com água da torneira enriquecida com solução nutritiva Hoagland a 40% a cada sete dias (Hoagland et al. 1950), por 30 dias de aclimação e obtenção de propágulos clonais para teste.

2.2 Testes de toxicidade aguda

Os propágulos clonais sem estolon produzidos por gemas axilares foram selecionados, para a uniformidade das plantas utilizadas no experimento. Eles foram inicialmente expostos a testes de toxicidade aguda de 96 horas.

A solução estoque dos herbicidas foi preparada diluindo o produto técnico (PT) em solução de Hoagland. Para o herbicida atrazina, foi usado o PT Primoleo (concentração de atrazina de 400 g/L), e para clomazona foi usado o PT Gamit (concentração de clomazona de 360 g/L).

Para os testes agudos de 96 h, 36 plantas foram colocadas, aleatoriamente, em 18 frascos de vidro (3 L), com três repetições, submetidas aos seguintes tratamentos nominais: de atrazina = 0, 20, 36, 65, 117 e 210 µg/L; de clomazona = 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L; e das misturas, cujas

concentrações foram definidas em função dos resultados dos testes individuais, sendo (0; 0), (0.125 mg/L, 1.25 mg/L), (0.25 mg/L, 2.5 mg/L), (0.5 mg/L, 5 mg/L), (0.1 mg/L, 10 mg/L), (0.2 mg/L, 20 mg/L, de atrazina e clomazona, respectivamente). Os testes foram estáticos com observação diária da mortalidade. Parâmetros físico-químicos, oxigênio dissolvido, o pH e a temperatura foram registrados no início e no final da exposição.

2.3 Índice de área foliar (IAF)

Ao término do teste agudo foi avaliado o índice de área foliar, para a quantificação do IAF foi medido o comprimento da folha na direção da nervura média (b) e a largura máxima da folha (a) perpendicular a nervura da folha, seguindo a equação proposta por Hall et al. (1993).

$$LAI = (\pi * b / a) / (\pi r^2)$$

2.4 Biomassa da planta e folha

Para a quantificação da biomassa, padronizamos que fosse coletada a quinta folha a emergir da planta, sendo uma (1) folha por planta (n = 6). Em seguida, toda a planta também foi coletada. As folhas e plantas foram coletadas ao término de 96 h, pesadas e aquecidas a 70 °C, até que seu peso seco se mantivesse constante. A biomassa foi calculada, seguindo a equação proposta por Westlake (1963).

$$\% \text{ Da massa seca} = \text{massa úmida (g)} / \text{massa seca (g)} * 100$$

2.5 Pigmentos fotossintéticos

Os conteúdos foliares de clorofila a, clorofila b e carotenoides foram avaliados com a terceira folha a emergir de cada planta coletada (1 folha por planta, n = 6). As folhas foram embrulhadas em papel alumínio e armazenadas a 4 °C, até o momento da análise. Cada folha foi amostrada com um furador de folhas, descartando-se as bordas, obtendo um peso <0,05 g. Posteriormente as amostras foram maceradas com 10 ml de acetona 100% e centrifugadas a 4000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram analisados em espectrofotômetro. As medições de absorbância em 470 nm, 645 nm e 662 nm foram inseridas nas seguintes equações para carotenoides totais (Cx + c; xantofilas e carotenos), clorofila a (Chl a) e clorofila b (Chl b) (Lichtenthaler et al., 2001):

$$C(x + c) (\mu\text{g} / \text{ml}) = (1000 A_{470} - 1,90 \text{ Chl } a - 63,14 \text{ Chl } b) / 214$$

$$\text{Chl } a (\mu\text{g} / \text{ml}) = 11,24 A_{662} - 2,04 A_{645}$$

$$\text{Chl } b (\mu\text{g} / \text{ml}) = 20,13 A_{645} - 4,19 A_{662}$$

Onde A: é o comprimento de onda de absorbância de leitura e acetona 100% foi usada como branco.

3. Resultados

3.1 Atrazina

O teste agudo (EC50) da atrazina não resultou em mortalidade, assim não foi possível observar uma curva concentração-resposta. A Figura 1 A, mostra uma tendência de aumento na área foliar de *E. crassipes*, após 96 h de exposição a atrazina que não foi significativa. Mostra ainda que a atrazina não teve efeito sobre a área foliar. Os níveis de clorofila a, b e carotenoides, também não foram afetados pela atrazina (Figura 1 C).

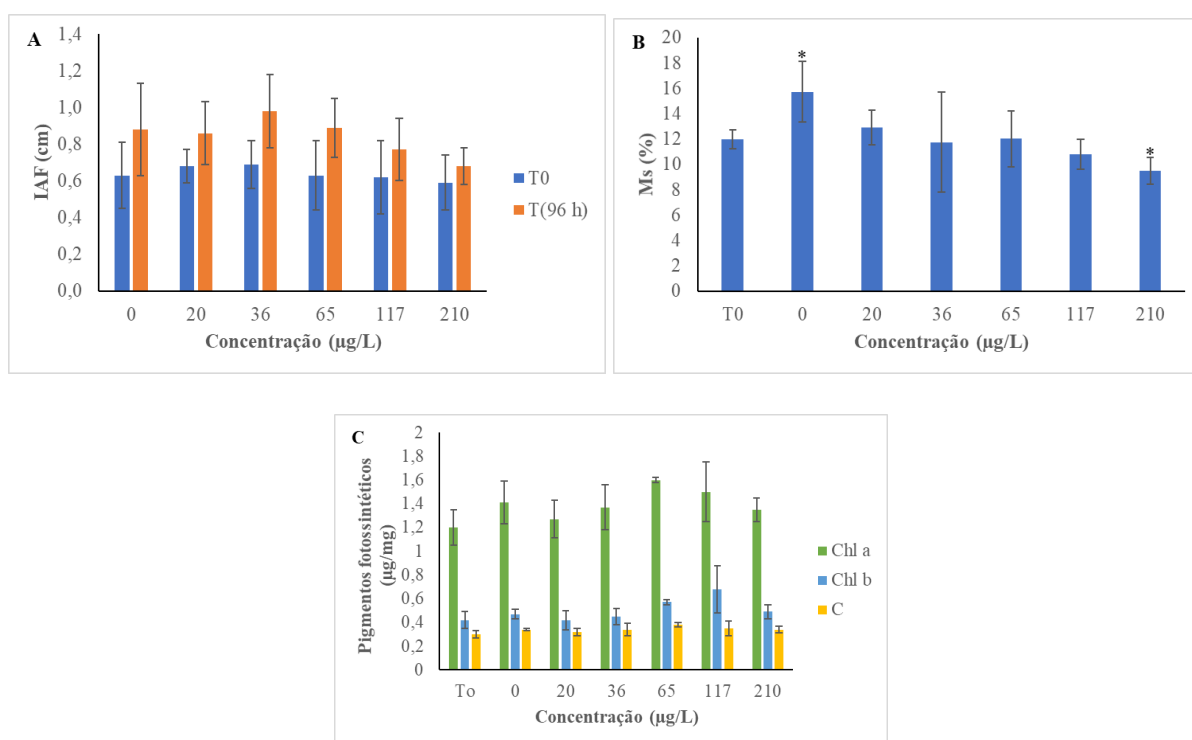


Figura 1 – (A) Índice de área foliar, (B) Biomassa da folha, e (C) Pigmentos fotossintéticos. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, e as diferenças estatísticas são apresentadas com (*), após 96 h de exposição a atrazina.

A biomassa da folha (Figura 1 B), por outro lado, mostrou uma redução quando exposta à concentração mais alta (210 µg/L), [F (1,16) = 13,83; p = <0,01]. Sendo assim, com base nestes resultados, que evidenciaram efeitos subletais sobre a biomassa das folhas, foi selecionada uma concentração subletal, para a realização do teste crônico, que será apresentado no capítulo 2.

3.2 Clomazona

A Figura 2 A, mostra o índice de área foliar, onde a anova de duas vias mostrou que houve um efeito da concentração [F (1,34) = 7,45; p = <0,05] sobre o IAF, após 96 h de exposição a clomazona, mostrando que a clomazona não afetou negativamente o crescimento das folhas. Similarmente, não houve diferença entre a biomassa das folhas em função da concentração.

Por outro lado, houve uma redução na concentração de pigmentos fotossintéticos clorofila b e carotenoides em função da concentração [F (1,16) = 5,85; p = <0,01] (Figura 2 C). O herbicida clomazona atuou diretamente no processo fotossintético da planta, inibindo a formação de pigmentos fotossintéticos na via biossintética dos carotenoides (VAN SCOY; TJEERDEMA, 2014).

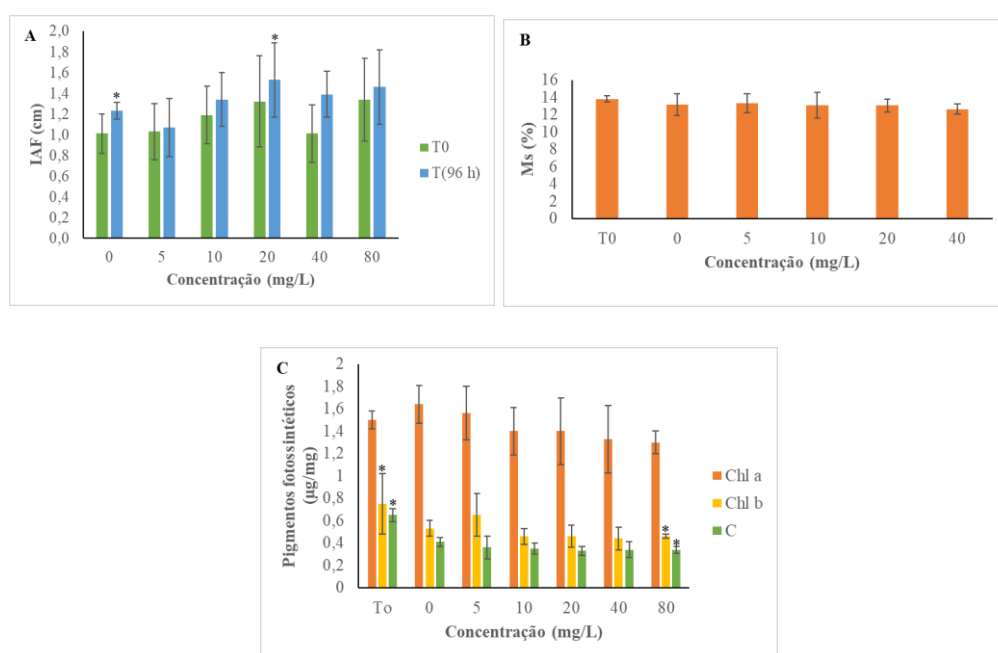


Figura 2 – (A) Índice de área foliar, (B) Biomassa da folha, e (C) Pigmentos fotossintéticos. Os valores são apresentados como média ± DP, e as diferenças estatísticas são apresentadas com (*), após 96 h de exposição a clomazona.

A redução na concentração de carotenoides gerou um clareamento nas folhas e os pecíolos mais jovens da planta (Figura 3). Segundo Yasuor et al. (2008), o herbicida clomazona

promove a peroxidação lipídica nas células, devido ao bloqueio da síntese de carotenoides no broto emergente, resultando em um branqueamento característico dos tecidos foliares novos. Essa ação evidencia que o herbicida interfere na fotossíntese, levando ao branqueamento das folhas de *E. crassipes*.



Figura 3 – Clareamento das folhas e pecíolos de *E. crassipes*, após 96 h de exposição a clomazona.

3.3 Mistura dos herbicidas atrazina e clomazona

A Figura 4 A, mostra uma redução pontual da área foliar de *E. crassipes* na concentração mais baixa, em função do tempo de exposição [$F(1,34) = 24,6$; $p < 0,001$]. A exposição da planta tanto ao herbicida atrazina como clomazona isoladamente não resultou em redução de área foliar, mas quando os herbicidas foram misturados, houve sinergismo, sugerindo que, juntos, um potencializou a ação do outro. No entanto, este efeito não foi concentração dependente. Em relação a biomassa das folhas (Figura 4 B), a mistura não causou efeitos adversos, sugerindo um efeito antagônico, uma vez que as folhas foram afetadas, quando expostas à maior concentração a atrazina.

O efeito mais pronunciado da mistura foi a anulação dos efeitos sobre os carotenoides causado pela clomazona. A Figura 4 C mostrou que, independente da concentração de cada herbicida na mistura, o nível de carotenoides, assim como dos demais pigmentos, não foi afetado, sugerindo, novamente, uma relação antagônica entre os dois herbicidas. Embora tenham sido conduzidos apenas testes agudos com exposição a altas concentrações, os resultados são interessantes e reforçam a importância de se considerar os efeitos causados pelas

misturas sobre os ecossistemas, uma vez que são às misturas que os ambientes estão expostos. O mecanismo pelo qual o efeito antagônico ocorreu é objeto de investigação. A clomazona age através da inibição da síntese de carotenoides, enquanto a atrazina age sobre o fotossistema II do vegetal, dificultando a sugestão de mecanismos que poderiam levar ao antagonismo observado.

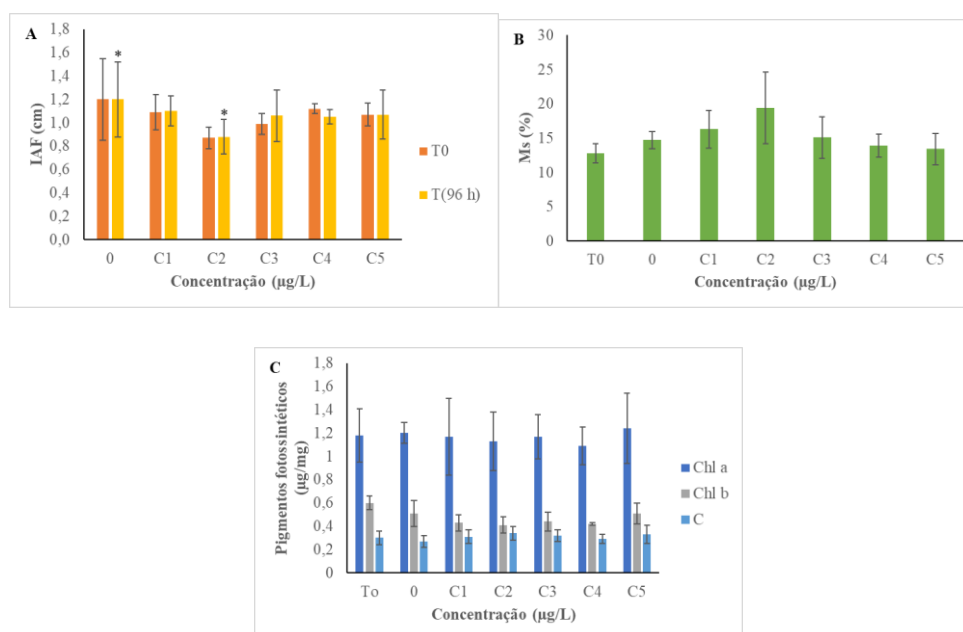


Figura 4 – (A) Índice de área foliar, (B) Biomassa da folha, e (C) Pigmentos fotossintéticos. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP, e as diferenças estadísticas são apresentadas com (*), após 96 h de exposição aos herbicidas atrazina e clomazona.

CAPÍTULO 2

GENOTOXIC AND ANATOMO-PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF ATRAZINE ON THE AQUATIC MACROPHYTE *Eichhornia crassipes* (MART.) SOLMS (PONTEDERIACEAE)

O manuscrito encontra-se no formato exigido pela Environmental Toxicology & Chemistry (Qualis A2, FI = 3,18), revista para a qual será submetido. No entanto, para facilitar a visualização, as figuras e tabelas foram incorporadas no texto principal.

**GENOTOXIC AND ANATOMO-PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF ATRAZINE ON
THE AQUATIC MACROPHYTE *Eichhornia crassipes* (MART.) SOLMS
(PONTEDERIACEAE)**

Gabriela Chavez Cossio¹, Pablo Santos Guimarães², Sergiane Caldas Barbosa³, Ednei
Gilberto Primel³, César Serra Bonifácio Costa⁴, Sonia Marisa Hefler^{1,2}, Samantha Eslava
Martins^{1,5 *}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Institute of
Biological Sciences, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Avenida Itália, Km 8,
96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

²Institute of Biological Sciences - ICB, Botânica Universidade Federal do Rio Grande -
FURG, Avenida Itália, Km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

³Laboratório de Análises de Contaminantes Orgânicos e Metais (LACOM), Escola de
Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Avenida Itália, Km 8,
96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

⁴Institute of Oceanography, Laboratory of Halophytes Biotechnology, Universidade Federal
do Rio Grande - FURG, Avenida Itália, Km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

⁵Norwegian Institute for Water Research (NIVA), Ecotoxicology and Risk Assessment
Department, Gaustadalléen 21, 0349, Oslo, Norway.

*Corresponding author:

Abstract

Agricultural activities in recent decades have intensified, hence increasing the use of pesticides in crops. Among them, atrazine is an herbicide largely used in some countries such as Brazil, despite its ban, due to its toxicity, in several countries. Among non-target species potentially affected by atrazine, *Eichhornia crassipes* is an aquatic macrophyte that responds anatomically and physiologically to the environmental conditions in which it develops, causing dysfunctions that can influence primary characteristics such as growth and development affecting photosynthesis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of atrazine on the anatomical structures of leaves, roots, physiological and genotoxic damage in meristematic cells of *E. crassipes* exposed to atrazine under semi-open conditions. Atrazine significantly affected the biomass of leaves and plant after two days of exposure, but the plant was able to recover, and even grow in the presence of this herbicide. Similarly, anatomical structures of the leaf, such as the adaxial epidermis (EAD), abaxial epidermis (EAB), palisade parenchyma (PP) and spongy parenchyma (PE), showed effects at the beginning of exposure and mostly recovered by the end of exposure (14 days). With respect to photosynthetic pigments, chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids levels increased over time regardless of atrazine concentration. Micronucleus was the most affected endpoint, showing that atrazine is genotoxic to *E. crassipes*. This study shows that *E. crassipes* is negatively affected by atrazine but also display recovery potential. The findings reinforce that atrazine negatively affects ecologically relevant species even at environmentally relevant concentrations and measures to reduce/control its use need to be established or refined in areas of authorized use.

Keywords: photosynthetic pigments, micronuclei, genotoxicity, herbicide.

1. Introduction

Agricultural activities in recent decades have been intensified, and hence the use of pesticides in crops. In this context, agricultural activities are among the ones that most contaminate aquatic ecosystems, since most chemicals are released into water bodies by aerial spraying, rainwater runoff, infiltration, or direct application (Silva et al. 2009; Pereira, 2012).

Brazil is one of the greatest World's powers in the agricultural sector, and it holds the largest pesticides market since 2008. Projections indicate that agricultural production in Brazil will continue increasing, and so will its demand for pesticides. Growth in 2020 relative to 2019 was estimated at 6.6% in terms of pesticide volume (975 000 tonnes) (Sarkar et al. 2021). The sale of crop protection products in Brazil, including pesticides, generates around US\$ 10 billion per year, which represents 20% of the global market, estimated at US\$ 50 billion (FAPESP, 2018).

Among the main pesticides used in Brazil, atrazine [2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine] is a selective herbicide belonging to the triazine family. Atrazine presents moderate solubility (33.0 mg/L at 25 °C) and persistence, adsorption coefficient to soil organic carbon (K_{oc}) ranging from 26 to 1164; and octanol-water partition coefficient ($\log K_{ow}$) of 2.61. Hydrolysis occurs slowly under neutral conditions but may be more important under acidic or alkaline environments based on hydrolysis half-lives of 240 and 100 days at pH 4 and 11, respectively (PubChem, 2021).

Due to its toxicity, atrazine has been banned in several countries of the European Union since 2003 (Montiel et al, 2019). In Brazil atrazine is classified by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) as moderately toxic to human health. As for the danger to ecosystems, atrazine is classified as very dangerous to the environment. Despite its toxicity,

atrazine ranks as the third most used pesticide in Brazil (Brovini et al, 2021) and authorizations for its use in new products have been recently granted in the country.

Atrazine is used to control broadleaf weeds and grasses in agriculture and is applied either in the pre-emergence, when it is absorbed by the plant through the root (root system), or in the post-emergence, when it is absorbed directly by the leaves, where it is quickly absorbed by the cuticle, cell wall, plasma membrane and the chloroplasts, leading to chlorosis, necrosis and death of the plant (Scherer et al. 2005; Ribeiro et al. 2020).

Atrazine binds to the binding site of plastoquinone QB (electron acceptor) interrupting the flow of electrons between the photosystems II and I. Following electron blockage, no reducing power (NADPH) and adenylate energy charge (ATP) are produced. Thus, it imposes a high energy charge on chlorophyll molecules, leading to reactive oxygen production (ROS) and, consequently lipid peroxidation of the membranes, destruction of leaf chlorophyll and inhibition of carbohydrate synthesis (Marchi et al. 2008; Albuquerque et al. 2019).

Non-target plants can also be negatively affected by herbicides. In this sense, aquatic macrophytes play a vital role in aquatic ecosystems for having a high biomass and high productivity (nutrient cycle and energy flow), providing food and habitat for aquatic and terrestrial organisms. Water hyacinths are important representative of these group, including the Brazilian water hyacinth *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms, which is a perennial floating aquatic macrophyte, monocotyledonous, native of South America but with cosmopolitan occurrence (Trindade et al. 2010). Water hyacinths are known for their use in phytoremediation due to their high potential to capture pesticides, heavy metals and other toxins and its ability to remove, degrade or isolate toxic substances from soils and aquatic ecosystems (Hurtado et al. 2010; Wang et al 2021). They have also been used as a ‘purifying agent’, justified by the intense

absorption of nutrients and their rapid growth (Lima, 2005; Rolon and Maltchik, 2006; Trindade et al. 2010).

E. crassipes respond anatomically and physiologically to the environmental conditions in which they develop, which may cause dysfunctions that can influence primary characteristics such as growth and development, the production of secondary structures and the number of pigments; thus, aquatic macrophytes submitted to any type of stress tend to lose their photosynthetic capacity and decrease the chlorophyll content of their leaves (Carter and Knapp, 2001; Jaramillo. 2018). However, the impact of herbicides on water hyacinth's anatomy and physiology is poorly studied and deserves attention. Therefore, this study aimed at elucidating atrazine effects on the anatomical structures of leaves and roots, as wells as physiological and genotoxic damage on meristematic cells of *E. crassipes* from southern Brazil.

2 Material and methods

2.1 Collection and cultivation of *Eichhornia crassipes*

Adult *Eichhornia crassipes* were collected in October 2019 at the Taim Ecological Station (32°50'S, 52°26'W), a strict nature reserve in Rio Grande, Southern Brazil. Collection was authorized by the Chico Mendes Institute for the Conservation of Biodiversity in Brazil (ICMBio; SISBIO authorization 60291-3). The plants were taken to an unheated greenhouse located at the FURG's Institute of Oceanography (Rio Grande, RS, Brazil), where they were cultured in 300 L water boxes with tap water enriched with Hoagland's nutrient solution at 40% every seven days (Hoagland et al. 1950) for 30 days acclimatization and obtaining of clonal propagules for testing.

2.2 Acute test

The clonal propagules without stolon produced by axillary buds were selected, for the uniformity of the plants used in the experiment. They were first exposed to a 96-h acute toxicity test, in order to determine the sublethal concentration for the chronic test.

Atrazine stock solution and exposure media were prepared by diluting the technical product PRIMOLEO (atrazine concentration of 400 g/L) in Hoagland solution. For the 96-h acute test, 36 plants were randomly placed in 18 glass flasks (3 L), with three replicates subjected to the following atrazine nominal treatments: 0, 20, 36, 65, 117 and 210 µg/L. The test was static with daily observation of mortality. Water Dissolved oxygen ranged from 7.07 to 12.58 mg/L, pH ranged from 6.5 to 7.0, and water temperature ranged from 27.1 to 30.6 °C. Sun irradiation was 10.59 ± 1.87 MJ/m²/day and estimated photoperiod was 13:40-13:46 h.

2.3 Chronic exposure

Clonal propagules were exposed to atrazine for 14 days, followed by 7 days of depuration. Atrazine stock solution and exposure media were prepared as described for acute exposure. 48 clonal propagules (mean weight = 58.4 g) were randomly placed in 24 glass flasks (2 plants per 3 L flask), with six replicates, submitted to no atrazine exposure (control) and three following nominal treatments chosen according to the following criteria: (1) an environmentally relevant concentration of 0.02 µg/L, (2) the Brazilian quality criterion (CONAMA, 2005) for surface waters of 2 µg/L, and (3) a sublethal concentration of 200 µg/L resulting from the acute toxicity test (see Section 3). Exposure media were renewed weekly. After 14 days, plants were exposed for 7 days to clean water (Hoagland solution made with in atrazine-free tap water) to allow for depuration and potential recovery from toxic effects.

Water temperature, pH and dissolved oxygen were measured before and after each renewal. Sun irradiation was 14.98 ± 0.83 and estimated photoperiod was 13:59 a 14:14 h. In

addition, in order to verify atrazine potential loss during exposure, atrazine was quantified along seven days (renewal interval time) at exposure days 0, 2, 4 and 7, as described in Section 2.3.1.

As a standard guideline for this toxicity test is not available, the reliability of the tests was checked following the Criteria for Reporting Ecotoxicity Data (Moermond et al. 2016), through the online platform SciRAP (scirap.org). Reliability was scored 95% and therefore the study was considered reliable.

Atrazine concentration in the experimental media, as well as anatomical, physiological and genetic endpoints were evaluated following chronic exposure to/depuration of atrazine, as described in sections 2.3.1 to 2.3.7.

2.3.1 *Atrazine quantification.*

The aqueous atrazine concentration was determined at exposure days 0, 2, 4 and 7, corresponding to the interval between water renewals. The sample preparation procedure, as well as the chromatographic determination, were performed according to the method proposed by Demoliner et al. (2010) at the Laboratory of Analysis of Organic and Metallic Compounds (LACOM) from the Federal University of Rio Grande (FURG). For the nominal concentrations 0.02 and 2 µg/L, samples were extracted by Solid Phase Extraction (SPE) with octadecylsilane cartridges prior to injection into the equipment, while samples at nominal concentration of 200 µg/L were acidified and injected directly into the equipment. Matrix matched standards were prepared with water from the control sample for the sample's quantification. Determinations were carried out with a Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) system. The limit of detection and quantification was 2 and 20 ng/L, respectively.

2.3.2 *Chlorosis and necrosis evaluation.*

At 0, 2, 7, 14 (exposure phase) and 21 days (depuration phase), healthy green leaves (from 12 plants per treatment) of *E. crassipes* exposed to the herbicide atrazine were analyzed for the incidence of chlorosis and necrosis, and compared to their corresponding control group (5-6 leaves from 12 control plants).

2.3.3 Leaf Area Index (LAI) analysis.

At days 0, 2, 7, 14 (exposure phase) and 21 (depuration phase), LAI was calculated. The leaf length in the mid rib direction (b) and the maximum leaf width (a) perpendicular to the leaf rib (n= 12) were used in the following equation of an ellipse proposed by Hall et al. (1993).

$$LAI = (\pi * b / a) / (\pi r^2)$$

2.3.4 Leaf and plant biomass.

For the biomass quantification, we standardized that the fifth leaf to emerge from the propagule was collected, one (1) leaf per plant (n=12). Following, the whole plant was also collected. Both leaves and plants were collected at days 0, 2, 7, 14 (exposure phase) and 21 (depuration phase), weighed and heated at 70° C until constant dry weight. Biomass was calculated following equation proposed by Westlake (1963).

$$\text{Dry mass \%} = \text{wet mass (g)} / \text{dry mass (g)} * 100$$

2.3.5 Analysis of photosynthetic pigments.

Leaf contents of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids were evaluated at days 0, 2, 7, 14 (exposure phase) and 21 (depuration phase). The third leaf to emerge from each propagule (1 leaf per plant, n=12) was collected, wrapped in aluminum foil and stored at 4°C until analysis. Each leaf was sampled with a leaf punch, discarding the edges, obtaining a weight <0.05 g. They were then macerated with 10 ml of acetone 100% and centrifuged at 4000 rpm for 10 min. Supernatants were analyzed in a spectrophotometer. Absorbance measurements at

470 nm, 645 nm and 662 nm, were entered in the following equations for total carotenoids (Cx+c; xanthophylls and carotenes), chlorophyll a (Chl a) and chlorophyll b (Chl b), following Lichtenthaler et al. (2001):

$$(1) C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.90 \text{ Chl a} - 63.14 \text{ Chl b}) / 214$$

$$(2) \text{Chl}_a (\mu\text{g/ml}) = 11.24 A_{662} - 2.04 A_{645}$$

$$(3) \text{Chl}_b (\mu\text{g/ml}) = 20.13 A_{645} - 4.19 A_{662}$$

Where A is the reading absorbance wavelength and acetone 100% was used as blank.

2.3.6 Leaf anatomical structure analysis.

At days 0, 2, 7, 14 (exposure phase) and 21 (depuration phase), the fourth leaf to emerge from each plant (1 leaf per plant, n=12) was collected, transversally fragmented into smaller pieces (edge, central mesophyll, lateral mesophyll and petiole), fixed in FAA solution (formaldehyde, glacial acetic acid, and ethyl alcohol), and stored in alcohol 70% (Kraus and Arduin, 1997). The fragmented leaves were embedded in paraffin and cut transversely with a microtome (2 μm). Two slides of each fragment were mounted, dewaxed and stained, and then observed and photographed under an optical microscope at 400x magnification.

Once the photographs were obtained, the anatomical structures were analyzed using the OPTHD Ver 3.7 software, measuring: (TLT) Total leaf thickness, (ADC) Adaxial cuticle, (ADE) Adaxial epidermis, (ABC) Abaxial cuticle, (ABE) Abaxial epidermis, (M) Mesophyll, (PP) Palisade parenchyma, and (PS) Spongy parenchyma (Pereira, 2012).

2.3.7 Root genotoxicity analysis.

For the evaluation of genotoxicity, 2 cm fragments from the root growth zone were collected at days 0, 2, 7, 14 (exposure phase) and 21 (depuration phase), fixed with Carnoy

solution, and stored in alcohol 70%. The slides were stained with safranine, where micronuclei and other nuclear anomalies were subsequently observed through the methodology proposed by Dash et al. (1988). The slides were analyzed and photographed under an optical microscope under 1000x magnification, 600 cells were counted per slide in duplicate.

The presence of chromosomal changes (micronuclei, irregular telophase, disorganized cell division), as well as the mitotic index, were used to verify the cytotoxic and genotoxic effects caused by atrazine.

The mitotic index (MI) was calculated using the equation:

$$\text{MI} = \text{number of cells in mitosis} / \text{total number of cells observed} * 100$$

While the chromosomal alterations (CA) were calculated following the equation:

$$\text{CA} = \text{number of cells with chromosomal alteration} / \text{total number of cells observed} * 100$$

2.4 Statistical analysis

There was no mortality during the acute toxicity test (EC50), so that it was not possible to obtain a concentration-response curve. Therefore, sublethal effects (Chavez et al. in preparation) were analyzed to define the sublethal exposure concentration for the chronic test.

In the chronic test, each endpoint was analyzed individually and compared with the control group over the exposure time; each treatment was also compared to each other, at each exposure time. The assumptions of normality and homoscedasticity were first checked, followed by the significance test using a one-way and two-way ANOVA with Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). When the data did not satisfy the ANOVA assumptions, non-parametric tests (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis) were used. In this study, statistical analyzes were performed using the RStudio package (version 1.3.1073, © 2009-2020 RStudio, PBC).

3 Results and discussion

The acute test (LC50) was performed in order to determine the sublethal atrazine concentration to be used in the chronic test, and details will not be present herein. In summary, there was no mortality, while adverse effects on leaf biometry, leaf biomass, and photosynthetic pigments were expressed at the highest nominal test concentration. Therefore, 200 µg/L was intended as the nominal sublethal concentration in the chronic test, whose results and discussion are present in the next sections.

3.1 Water analysis and atrazine quantification

According to Brovini et al. (2021), atrazine concentrations in Rio Grande range from 0.015 µg/L - 0.25 µg/L. More precisely, *E. crassipes* plants were collected at the Taim Ecological Station, where preliminary studies determined the presence of atrazine in surface water bodies at concentrations of <0.005 to 0.028 µg/L (Caldas et al., In preparation).

The result of atrazine quantification showed that atrazine concentration remained constant over seven days between exchanges, confirming that our experimental design (water renewal every 7 days) was appropriate for the test. However, there was a wide variation between the planned nominal concentration and the measured concentration (Table S1), especially at the lowest exposure concentration. Therefore, the results are from now and henceforth expressed as measured exposure concentrations: 0.4 µg/L, 2.1 µg/L and 113 µg/L.

Water quality parameters throughout the experiment were: temperature from 24.5 to 40 °C; dissolved oxygen values range between 7.6 and 13 mg/L; pH ranged between 6 and 7 (Table S2).

3.2 Mortality, chlorotic and necrotic leaves

Healthy green leaves of *E. crassipes* evolved to chlorosis and necrosis after exposure to atrazine. Figure 1A shows that atrazine caused leaves to undergo chlorosis from the lowest exposure concentration, reaching a high number of chlorotic cells at 113 µg/L, tested by one-way ANOVA [$F(3,24) = 9.40$; $p < 0.005$]. Necrotic leaves (Figure 1 B) were induced at 2.1 and 113 µg/L after 14 days of exposure to atrazine [$F(3,05) = 10.66$; $p < 0.005$]. Conversely, Brain et al. (2012) found out that *Lemna gibba* exposed to atrazine (5 to 160 µg/L) for 14 days and followed by a recovery phase in herbicide-free water for 7-14 days, did not die neither presented leaves with chlorosis or necrosis, recover in all treatment groups.

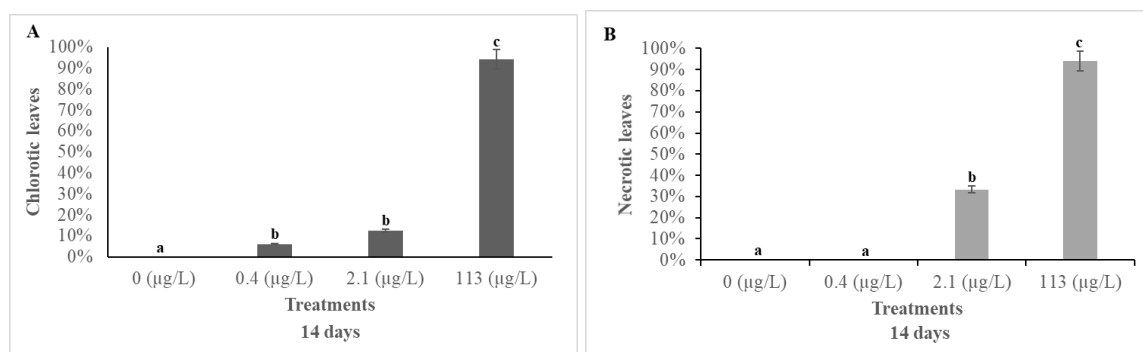


Figure 1. Number of chlorotic (A) and necrotic (B) leaves after 14 days exposure to atrazine (n=12). Values are presented as mean $\pm$ SD the plants were exposed for 14 days.

At the highest exposure concentration, the plants could not recover from the effects of atrazine and the aerial part of the plant died after 14 days of exposure. Previous studies have shown that necrosis was a common symptom after plants were exposed to herbicides (Sunohara and Matsumoto, 2004; Huiyun et al. 2008). According to Streit et al. (2005) and Albuquerque et al. (2019), when there is a blockage in the flow of electrons between photosystems, no reducing power (NADPH) and adenylate energy charge (ATP) are produced, causing a large energy charge in the chlorophyll molecules, leading to production reactive oxygen (ROS),

which produce free radicals leading to peroxidation of lipids in membranes, destruction of leaf chlorophyll, inhibition of carbohydrate synthesis and chlorosis.

3.3 Effects on *E. crassipes* plant and leaves biometry and biomass

Figure 2A shows a reduction in *E. crassipes* leaf area observed at 14 days of exposure to the highest concentration (113 $\mu\text{g/L}$), tested by two-way ANOVA [$F(3,3) = 9.79$; $p < 0.001$]. According to Suresh and Teajun (2010) and Albrecht et al. (2004), the leaf area of *Lemna* sp. fronds was reduced in the presence of atrazine and simazine, as well as Mazzeo et al. (1998) reported reduction of the leaf area of *Lemna gibba* at 14 days of exposure to simazine. According to Silveira et al. (2015), the reduction in leaf biomass of *E. crassipes* is mainly due to nitrogen deficiency, and this occurs because the herbicide atrazine blocks the flow of electrons between photosystems I and II in the plant.

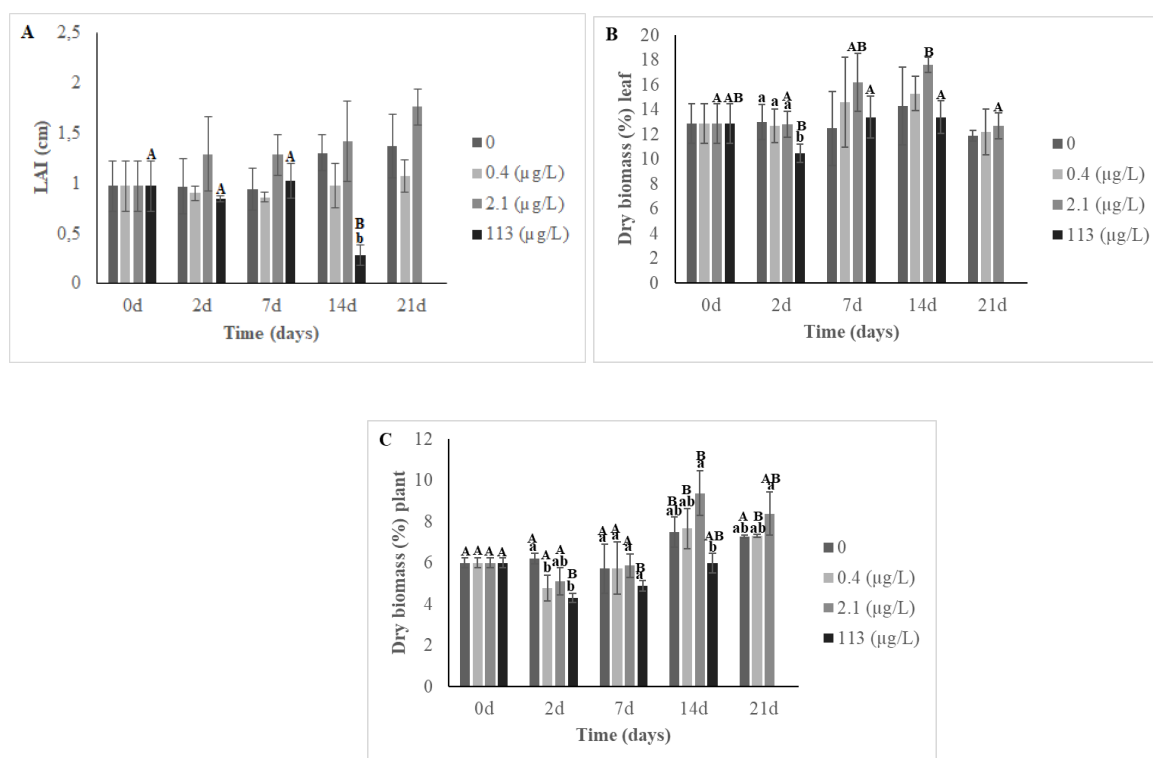


Figure 2. (A) Leaf area Index, (B) Leaf biomass, (C) Plant biomass. Values are presented as mean $\pm$ SD, the plants were exposed for 14 days followed by 7 days of depuration. Lowercase letters indicate differences between concentrations within the same sampling time, and capital letters differences between sampling times for the same concentration.

Figure 2B shows the dry biomass of the leaves after 2, 7, 14, and 21 days, where the two-way ANOVA showed that there is an effect of time [$F(3,32) = 8.24$; $p = <0.001$] and concentration [$F(3,32) = 5.25$; $p = <0.01$] on the biomass. At 2 days of exposure there was a reduction in leaf biomass of *E. crassipes* at the highest exposure concentration, but the effect was not maintained, as the leaves recovered and maintained biomass similar to the control group at the end of the exposure time.

According to Kemp et al. (1985) and Brain et al. (2012), the rooted and floating macrophyte species *Potamogeton perfoliatus*, *Myriophyllum spicatum*, and *Lemna gibba*, showed a biomass inhibition at 14 days after exposure to up to 100 $\mu\text{g/L}$, but in all exposure scenarios they recovered completely from the initial inhibition after 7 days in atrazine-free medium. In our study, on the other hand, *E. crassipes* at the highest concentration (113 $\mu\text{g/L}$) was not able to recover and the aerial part of the plant died.

Kemp et al. (1985) reported a reduction in the biomass of *P. perfoliatus* and *M. spicatum* at 30 and 91 $\mu\text{g/L}$ of atrazine, respectively, following 28-day exposure. Conversely, in our study there was a reduction in plant biomass after 2 days of exposure, but except for the highest concentration, plants were able to recover and gain biomass, even when exposed to atrazine (Figure 2C, two-way ANOVA [effect of time: $F(3,32) = 33.9$; $p = <0.001$] and concentration: [$F(3,32) = 12.11$; $p = <0.01$]). At 113 $\mu\text{g/L}$, the plants maintained the biomass at levels of the control group at the end of 14 days of exposure but did not survive throughout the depuration phase.

Biomass and leaf area index allow analyzing plant growth through dry matter accumulation, which depends on leaf area, leaf functioning and foliage persistence time (Hunt et al. 2002). The effects of atrazine on this parameter were acute (2 days) and the plant

recovered, and even grew, in the presence of atrazine. This result corroborates with Brain et al. (2012), who showed that *L. gibba* fully recovered from initial inhibition and grew over after 7 days in atrazine-free medium and suggests that the ability of aquatic macrophytes to recover from atrazine effects is independent of the exposure intensity, although the recovery rates vary according to the growth strategy of the species.

3.4 Effects of atrazine on photosynthetic pigments

Chlorophyll is one of the main indicators of photosynthetic capacity in plants during their development cycle in the presence of contaminants (Cruz et al. 2009; Salazar et al. 2018). A two-way ANOVA showed that there was effect of time [$F(1,16) = 8.33$; $p < 0.001$] and concentration [$F(1,16) = 2.48$; $p < 0.01$] on chlorophyll a (Figure 3A), while only time [$F(1,32) = 6.69$; $p < 0.01$] affected chlorophyll b (Figure 3B). Both chl a, b and carotenoids levels significantly increased over the exposure time, except at the highest atrazine concentration, in which chl content was maintained in the same levels throughout the exposure. Similar results were found when *E. crassipes* was exposed for 144 h to wastewater containing arsenic, copper, iron, lead, zinc, sulfide and cyanide, which induced the increase of chlorophyll a and b levels, justified as a response to the stress conditions to which the plant was subjected, thus ensuring photosynthesis (Salazar et al. 2018). Conversely, Huiyun et al. (2009) evidenced that the content of chlorophyll a in macrophytes *Ceratophyllum demersum* and *Vallisneria spiralis* exposed to atrazine (0.0005 to 0.5 mg/L) for 21 days, decreased overtime. Differences in the structure and life habits of different macrophyte species suggest interspecific response variability.

Studies on the atrazine effects on macrophyte species photosynthesis have shown inhibition of photosynthesis *Lemna minor* exposed to 100 µg/L, atrazine blocked the transport of electrons in photosystem II (Frankart et al. 2003), photosynthesis inhibition in *V. americana*

exposed to 75 $\mu\text{g/L}$ for 12 to 28 days (Corell and Wu, 1981), and in *M. spicatum* following exposure to 11 $\mu\text{g/L}$ for 4 weeks (Larsen et al. 1986); and a slightly inhibition of 10% in photosynthesis in *P. perfoliatus* exposed to 4 $\mu\text{g/L}$ for 4 weeks (Kemp et al. 1985).

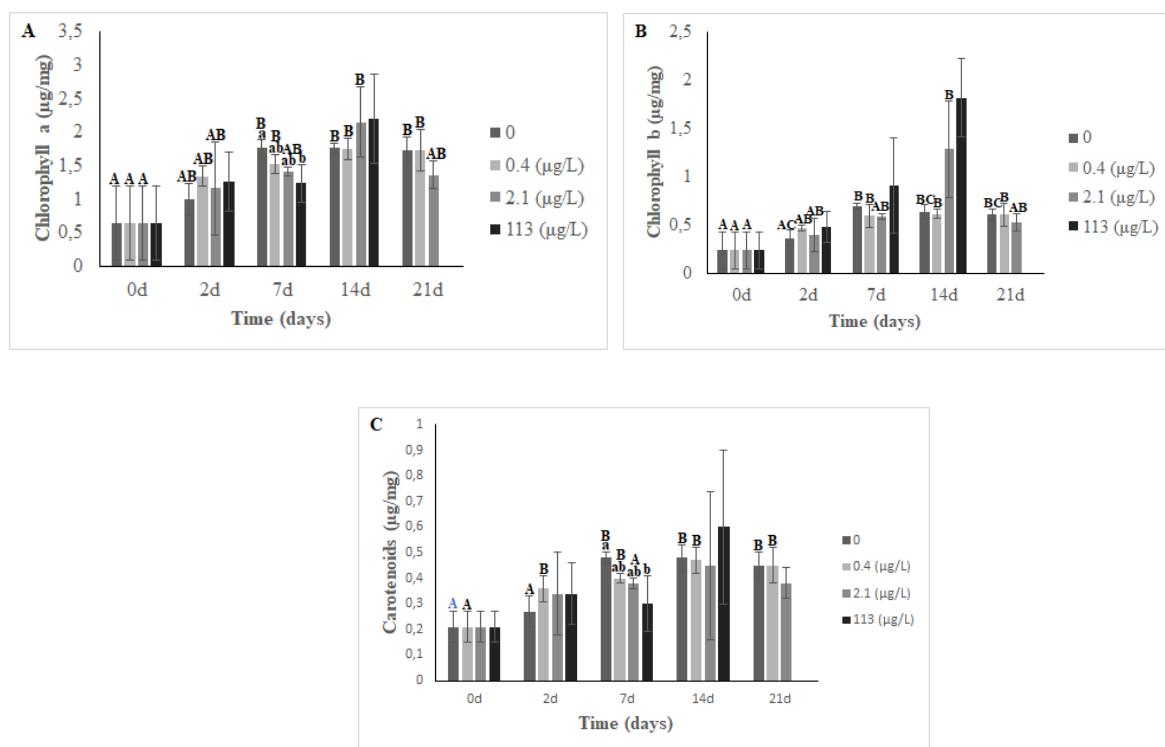


Figure 3. Concentration of (A) Chlorophyll a, (B) Chlorophyll b, and (C) Carotenoids. Values are presented as mean $\pm$ SD, the plants were exposed for 14 days followed by 7 days of depuration. Lowercase letters indicate differences between concentrations within the same sampling time, and capital letters differences between sampling times for the same concentration.

Carotenoid levels (Figure 3C) increased over time in the control group and at the lowest concentration 0.4 $\mu\text{g/L}$, but not at the highest concentration (113 $\mu\text{g/L}$) [$F(1.32) = 4.29$; $p < 0.01$]. According to Ávila et al. (2012), carotenoids have an antioxidant function and act as accessory pigments for photosynthesis, when plants are subjected to stress conditions, the proportion of carotens increases to protect tissues. Although in this study carotenoid levels followed the same trend as chlorophyll a, we suggest that, at 113 $\mu\text{g/L}$, the photoprotective system was already collapsed by day 7, indicating that the plants would probably not recover.

3.5 Effects of atrazine on leaf anatomy

External lesions of plants are visible to the eye and stand out as the most used method to assess the sensitivity of plant species to various stress factors; however, a more robust evaluation requires microscopic observations, as these are essential to obtain an early diagnosis of damage, even before such damages are visible in the external body of the plant (Santos and Azevedo, 2007; Barbosa et al., 2009).

Depending on the environmental pressure, leaf tissues may show changes in thickness and proportion. Changes in cuticle, epidermis, palisade parenchyma, spongy parenchyma and aerenchyma, among others, have been attributed to toxic substances such as metals (Zn, Cd, Co, Cr, Fe, Cu, Pb, Ni) in *E. crassipes* and *Salvinia natans* (Almeida, 2012, Dhir et al. 2011, Dhir et al. 2013). Similarly, *E. crassipes* subjected to stress by dumping from a textile industry showed a significant reduction in the growth and size of plant cells (Mahmood et al., 2005).

However, despite the various studies that describe the structural changes of *E. crassipes* caused by pollutants in aquatic environments (Pätsinkkä et al. 2002; Mahmood et al. 2005; Lage, 2008; Castro et al. 2009; Pereira, 2012; Mاتيولli, 2014), little is known on the effect of atrazine on these structures. Therefore, our findings bring an important contribution to the knowledge on atrazine effects on leaves structural anatomy and the recovery potential in *E. crassipes*. Overall, parenchyma, epidermis, cuticle and mesophyll thickness were not affected by atrazine (Figures 4, S1 and S2). Changes overtime were seen in all structures, but the tissues were able to recover by the end of exposure time. It is noteworthy that in this study at the highest concentration (113 µg /L), the plants did not recover in atrazine-free water and the aerial part of the plant died. Therefore, leaves to verify anatomical structures were not collected following the depuration phase.

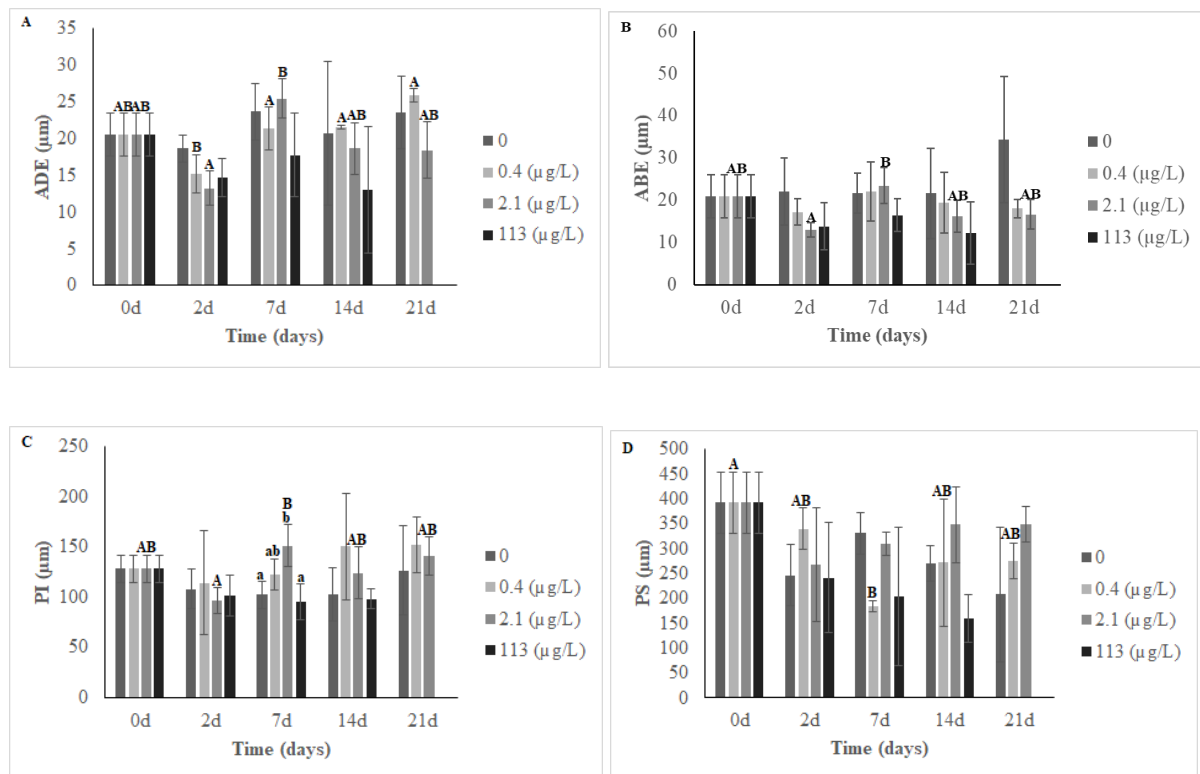


Figure 4. Effects of atrazine on leaves anatomy. (A) Adaxial epidermis (ADE), (B) Abaxial epidermis (ABE), (C) Palisade parenchyma (PI), (D) Spongy parenchyma (PS). Values are presented as mean $\pm$ SD, the plants were exposed for 14 days followed by 7 days of depuration. Lowercase letters indicate differences between concentrations within the same sampling time, and capital letters differences between sampling times for the same concentration.

3.6 Cell cycle and genotoxic effects on root cells

Macrophytes roots also respond to environmental changes; they are in direct contact with water, assimilating the toxic substances present in the environment, and can be used for the evaluation of environmental genotoxicity and/or mutagenicity, using chromosomal changes and abnormalities during cell divisions of root meristematic cells as indicators (Matiolli, 2014). In fact, cytotoxic studies with plants have shown changes in DNA, impairing root tips cell proliferation leading to damage to genetic material such as the appearance of micronuclei (Grover and Kaur, 1999; Matioli, 2014). In the present study, atrazine effects on cell division (Figure 5), including genotoxic effects (Figure 6, 7, supplemental Figure S4) were investigated.

The Mitotic index is shown in figure 5. After 2 days of exposure, cell division was inhibited at 2.1 and 113 $\mu\text{g/L}$ [$F(3.34) = 7.15$; $p < 0.001$], but there was recovery over time. At the end of exposure, the ratio of cells in each division stage was similar among treatments. At 113 $\mu\text{g/L}$, cell division dropped again following depuration time. Although roots were analyzed at day 21, plants were dead or dying (lack of green leaves) at the highest exposure concentration, hence cell division was reduced [$F(3.34) = 4.57$; $p < 0.01$]. The mitotic index is used as an indicator of adequate cell proliferation, the increase or decrease in the mitotic index represents evidence of cytotoxic effects (Leme et al., 2009; Tedesco et al., 2012).

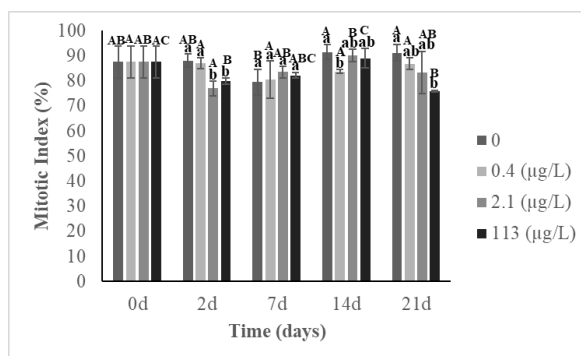


Figure 5. Effects of atrazine on the mitotic index in meristematic root cell division. Values are presented as mean $\pm$ SD, the plants were exposed for 14 days followed by 7 days of depuration. Lowercase letters indicate differences between concentrations within the same sampling time, and capital letters differences between sampling times for the same concentration.

Bolle et al. (2004) reported chromosomal changes and mitotic index inhibition in *Allium cepa* meristematic cells exposed to atrazine for 5 days (5 $\mu\text{g/L}$), characterizing atrazine as a clastogenic agent by the presence of cells with chromosomal breaks. In our study, meristematic cells of *E. crassipes* exposed to atrazine also underwent inhibition in the mitotic index at two days of exposure, but cell division was restored overtime.

Genotoxicity was expressed by the presence of chromosomal aberrations found in the treated cells, including cells with anaphasic bridge and chromosome breakage, cells with

irregular telophase, cells with disorganized cell division, and micronucleated cells (Figures 6, 7 and S3).

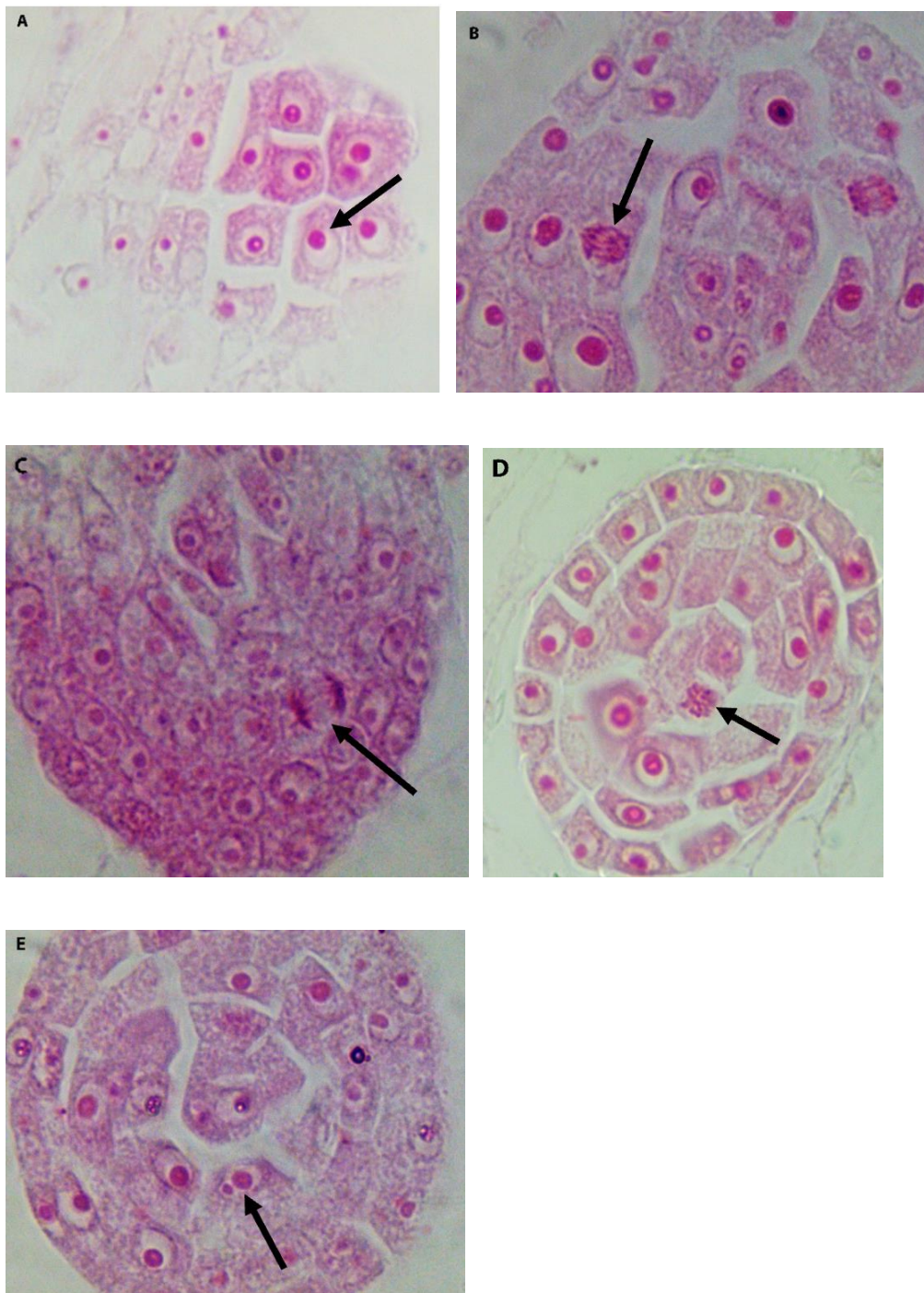


Figure 6 *E. crassipes* meristematic cells root, (A) normal cell, (B) Anaphasic bridge with chromosomal break, (C) Irregular telophase, (D) Disorganized division, (E) Micronucleus.

El-Ghamery et al. (2000) had previously described atrazine genotoxic effects on root cells of *A. cepa* and *Vicia faba*, but only organisms exposed for 24 h to the very high concentration of 3.75 g/L were affected by damages such as bridges and a few MNC. Similarly, Srivastava and Mishra (2009) reported cytogenetic effects of atrazine on root meristematic cells of *A. cepa* and *V.* exposed for 24 hours at 15-70 mg/L, evidenced by inhibition of the mitotic index, induction of chromosomal changes and micronucleated cells (MNC).

In our study, the incidence of MNC was the most pronounced atrazine effect on *E. crassipes*, even at environmentally relevant concentrations. MNC incidence increased from days 7 and 2, respectively following exposure from 0.4 and 2.1 $\mu\text{g/L}$ [$F(3.34) = 5.95$; $p = <0.01$]. MNC incidence was also concentration dependent. After 2 days, higher incidences were found at 2.1 and 113 $\mu\text{g/L}$ compared to the control group. After 7 and 14 days, all exposure concentrations exhibited MNC incidences significantly higher than in the control group [$F(3.34) = 84.41$; $p = <0.001$]. Micronucleus is an irreversible damage; therefore, cells were not able to recover during the depuration phase.

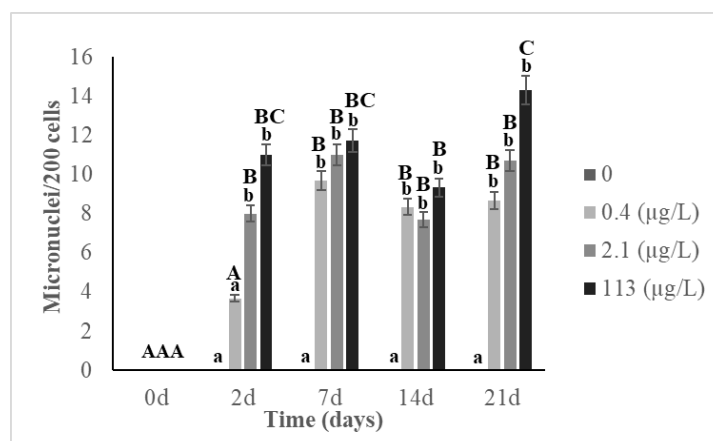


Figure 7. Micronucleated cells (MNC) incidence following exposure to atrazine. Values are presented as mean $\pm$ SD, the plants were exposed for 14 days followed by 7 days of depuration. Lowercase letters indicate differences between concentrations within the same sampling time, and capital letters differences between sampling times for the same concentration.

Atrazine has a mechanism of action that is unique to plants, therefore, its toxic potency tends to be greater and more efficient in plants than in animals. (Solomon et al., 2008). Yet, atrazine effects on non-target aquatic plants are still poorly understood. The present study indicated some sensitive as well tolerant biological endpoints to atrazine exposure, including at environmentally relevant levels, using the aquatic macrophyte *Eichhornia crassipes* as biological model. Overall, the anatomy of leaf tissues was not affected by atrazine at any exposure concentration. Similarly, at the lowest exposure concentrations (0.4 and 2.1 µg/L), most leaf endpoints, including biometry and pigment levels, did not change following exposure. On the other hand, at the highest exposure concentration (113 µg/L), visual effects such as biometry, chlorosis and necrosis were identified.

Similarly, most endpoints analyzed in root meristematic cells were not affected by atrazine. The exception is the incidence of MNC, which was clearly the most important atrazine effect evidenced in this study. Our results showed that concentrations as low as 0.4 µg/L caused the incidence of MNC to increase significantly, and levels were concentration dependent.

In Brazil, in order to protect aquatic life, the National Environment Council (CONAMA) established atrazine maximum level of 2 µg/L in surface waters (CONAMA 357, 2005), based on results from toxicity tests. Although our study showed that atrazine was overall not toxic to at 2.1 µg/L, it also showed that the incidence of MNC at all exposure concentrations was significantly higher than in the control group, indicating that atrazine is very genotoxic to *E. crassipes*.

Studies on atrazine genotoxicity to plants are scarce. To our knowledge, this is the first study to quantify the incidence of MNC in *E. crassipes* following exposure to atrazine, and the results showed concern, as stated above. A few studies were performed to verify atrazine genotoxicity in other plant species exposed in water. Srivastava and Mishra (2009) evidenced

that atrazine induced MNC in *A. cepa* and *V. faba* root cells after 24 h exposure, but only concentrations above 15 mg/L were tested. Mohamed and Ma (1999) exposed *Tradescantia paludosa* for 6 hours and showed that MNC were induced at concentrations above 100 mg/L, but not at concentrations ranging from 5 to 50 mg/L.

Considering that the use of atrazine is authorized in Brazil and many other countries, and concentrations ranging from <0.005 to 99.9 µg/L have been found in Brazilian freshwater bodies (Caldas et al., In preparation; Brovini et al. (2021), Bortoluzzi et al., 2006), it is imperative that studies concerning atrazine genotoxic effects on non-target aquatic macrophytes, particularly at environmentally relevant concentrations, are performed. In this sense, micronucleus is a biomarker used as an early warning system for pollution, and the incorporation of this analysis in monitoring programs to identify pollution-related genotoxic effects has been proved important and it is encouraged (Bolognesi and Hayashi, 2011; Oubane et al., 2020), being an important tool to support decision makings in water bodies management.

4 Conclusion

This was the first study to investigate atrazine effects on different leaf and root endpoints in *E. crassipes*. The results reinforced that atrazine negatively affects living organisms, even at relevant environmental concentrations. In special, the incidence of MNC was strongly induced by this herbicide, reinforcing the use of the micronucleus assay in monitoring programs. Genotoxic effects were reported at concentrations as low as environmental concentration and the current water quality criterion in Brazil, suggesting that the current regulation may not be sufficient to protect living organisms from atrazine effects and may need refinement. However, further studies to investigate the sensitivity of other aquatic macrophytes species to this herbicide are needed.

5 Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (Proc. # 407734/2016- 3). Cossio, G.C. was supported by PAEC OEA / GCUB, Notice OEA/GCUB No. 001/2018, under the Cooperation Agreement between the Organization of American States (OEA) and the Coimbra Group of Brazilian Universities (CGUB). Primel, E.G. is a productivity research fellowship from the CNPq (DT 305716/2020-4). We thank Andressa de Souza Ávila and Jade Medeiros for helping with *E. crassipes* culture and testing, Sabrina Pereira, Carolina Perry and Miriam Bicho for making the anatomical cuts, and Carolina Igansi Duarte for helping in the analysis of photosynthetic pigments.

6 References

Albrecht, M., Johnson, R. D., Duke, S. O., Scheffler, B. E., 2004. Dose-response relationships between herbicides with diferente modes of action and growth of *Lemna paucicostata*: an improved ecotoxicological method. <https://doi.org/10.1897/03-256>.

Albuquerque, F. P., Oliveira, J. L., Moschini, V. C., Fernandes, L. F., 2019. An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134868>.

Almeida, W. G., 2012. Aspectos ecológicos da comunidade de macrófitas aquáticas na represa do funil, MG: perspectiva para o manejo. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, MG.

Avila, O., Casierra, F., Riascos, D., 2012. Cambios diarios del contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de caléndula bajo sol y sombra. <https://doi.org/10.21897/rta.v17i1.697>.

- Barbosa, A. C., Gentil, I. C., 2009. Histórico do manejo de macrófitas aquáticas no reservatório Guarapiranga. In: seminário de recursos hídricos da bacia hidrográfica do paraíba do sul: recuperação de áreas degradadas, serviços ambientais e sustentabilidade. <https://doi.org/10.4136/serhidro.76>.
- Bolle, P., Mastrangelo, S., Tucci, P., Evandri, M.G., 2004. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. <https://doi.org/10.1002/em.20007>.
- Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26 (1), 205–213.
- Bortoluzzi, E. C., Rheiniheimer, D. S., Gonçalves, C. S., Pellegrini, J. B. R., Zanella, R., Copetti, A. C. C., 2006. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662006000400015>.
- Brain, R. A., Hoberg, J., Hosmer, A. J., Wall, S. B., 2012. Influence of light intensity on the toxicity of atrazine to the submerged freshwater aquatic macrophyte *Elodea canadenses*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.12.001>.
- Brasil. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e da outras providencias. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 março 2005.
- Brovini, M. E., Deus, T. C. B., Vilas-Boas, J. A., Quadra, R. G., Carbalho, L., Mendonça, F. R., Pereira, O. R., Cardoso, J. S., 2021. Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentration and potential environmental risks. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>.

- Carter, C. M., Knapp, M. D., 2001. Comparison of the genetic structure of North and South American populations of a clonal aquatic plant. <https://doi.org/10.1023/A:1014510730268>.
- Castro, E. M., Pereira, F. J.; Paiva, R., 2009. Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: Universidade Federal de Lavras.
- Corell, D. L., Wu, T. L., 1982. Atrazine toxicity to submersed vascular plants in simulated estuarine microcosms. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(82\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0304-3770(82)90094-8).
- Costa, J. A., Souza, J. P., Teixeira, P. A., Nabout, C. J., Carneiro, M. F., 2018. Eutrophication in aquatic ecosystems: a scientometric study. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X3016>.
- Cruz, A., Fortes, D., Herrera, R., García, M., González, S., Romero, A., 2009. Comportamiento de los pigmentos fotosintéticos, según la edad de rebrote después del pastoreo de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 en la estación poco lluviosa. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017783016/> (Acceso 27 de marzo 2021).
- Dash, S., Panda, K. K., Panda, B. B., 1988. Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(88\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(88)90003-9).
- Demoliner, A., Caldas, S. S., Costa, F. P., Gonçalves, F. F., Clementin, R. M., Milani, M. R., Primel, E. G., 2010. Development and validation of a method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the determination of multiple classes of pesticides and metabolites in water samples. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010000800003>.
- Dhir, B., Kumar, R., Mehta, D., Saradhi, P., Sharma, A., Sharmilla, P., 2011. Heavy metal induced physiological alteration in *Salvinia natans*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.05.009>.

- Dhir, B., Srivastava, S., 2013. Heavy metal tolerance in metal hyperaccumulator plant, *Salvinia natans*. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-0988-5>.
- El-Ghamery, A. A., El-Nahas, A. I., Mansour, M. M., 2000. The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. <https://doi.org/10.1508/cytologia.65.277>.
- FAPESP, 2018. Agrotóxicos na berlinda. <https://revistapesquisa.fapesp.br/agrotoxicos-naberlinda/> (Acesso 21 de dez 2020).
- Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G., 2003. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00067-9).
- Grant, W. F., 1978. Chromosome aberrations in plants as monitoring system. <https://doi.org/10.1289/ehp.782737>.
- Grover, I. S., Kaur, S., 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00065-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00065-2).
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. <http://hdl.handle.net/2027/uc2.ark:/13960/t51g1sb8j/> (Accessed 5 Mar 2019).
- Hunt, R., Causton, D. R., Shipley, B., Askew, A. P., 2002. A modern tool for classical plant growth analysis. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf214>.
- Hurtado, A., Torres, C., Peña, E. J., 2010. Identificación de procesos de bioacumulación de cromo en la laguna de Sonso. <https://www.researchgate.net/publication/282121341/> (Acesso 15 de mayo 2021).

Huiyun, P., Xiaolu, L., Xiaohua, X., Shixiang, G., 2009. Phytotoxicity of four herbicides on *Ceratophyllum demersum*, *Vallisneria natans* and *Elodea nuttallii*.

[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62269-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62269-X).

IBGE, 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo agro.

https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html/
(Acesso 12 de maio 2020).

Jaramillo, S. M. T., Giraldo, Y. M., Serna, O. D. M., 2018. Efectos en el nivel fotosintético en tres especies de plantas acuáticas sometidas a un tratamiento con agua residual de origen minero. <https://doi.org/10.17151/bccm.2018.22.1.3>.

Kemp, W. M., Boynton, W. R., Cunningham, J. J., Stevenson, J. c., Jones, T. W., Means, J. C., 1985. Effects of atrazine and linuron on photosynthesis and growth of the macrophytes, *Potamogeton Perfoliatus* L. and *Myriophyllum spicatum* L. in an estuarine environment. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0141-1136(85)90023-6).

Kraus, J. E., Arduin, M., 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/1997/01/manual-basico-de-metodos-em-morfologia-vegetal/>(Acesso 2 de maio 2019).

Lage, P. F., 2008. Alterações ecofisiológicas e estruturais em *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé) no rio Paraíba do Sul e rio Imbé. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro”, Rio de Janeiro.

Larsen, D. P., DeNoyelles, F., Stay, F., Shiroyama, T., 1986. Comparisons of single-species, microcosm and experimental and responses to atrazine exposure. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620050209>.

Lichtenthaler, K. H., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>.

Lima, M. R., 2005. Atributos de solos e macrófitas aquáticas flutuantes: uma contribuição a sustentabilidade agrícola e ambiental na bacia do rio Irai (PR). Tese de Doutorado.

Universidade Federal do Paraná.

Leme, D. M., Morales, M. A. M., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>.

Mohammed, K. B., Ma, T. H., 1999. *Tradescantia*-micronucleus and –stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides.

[https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00067-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00067-6).

Mahmood, Q., Zheng, P., Siddiqi, M., Islam, E., Azim, M., Hayat, Y., 2005. Anatomical studies on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) under the influence of textile wastewater. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.b0991>.

Marchi, G. M., Marchi, E. C. S., Guimarães, T. G., 2008. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/571939/1/doc227.pdf> (Acesso 10 de maio 2021).

Matiolli, L. S., 2014. Avaliação da citotoxicidade e atividade antioxidante de plantas condimentares. Tese (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual Paulista.

Mazzeo, N., Dardano, B., Maticorena, A., 1998. Interclonal variation in response to simazine stress in *Lemna gibba* (Lemnaceae). <https://doi.org/10.1023/A:1014304310756>.

Mazen, A., Maghraby, O., 1998. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. <https://doi.org/10.1023/A:1001174132428>.

Montiel, L. J. M., Munoz, G., Duy, S.V., Do, D.T., Vaudreuil, M.A., Goeury, K., Guillemette, F., Amyot, M., Sauvé, S., 2019. Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.125>.

Oubane, M., Khadra, A., Ezzariai, A., El Feuls, L., Kouisni, L., Hafidi, M., 2020. Micronucleus assay based on *Vicia faba* roots as a tool to assess the performances of wastewater treatment systems *Environmental Technology & Innovation* 19: 100903. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100903>.

Pätsikkä, E., Kairavuo, M., Sêrsên, F., Aro, E. M., Tyystjärvi, E., 2002. Excess Copper Predisposes Photosystem II to Photoinhibition in Vivo by Outcompeting Iron and Causing Decrease in Leaf Chlorophyll. <https://doi.org/10.1104/pp.004788>.

Pereira, F. J. Características anatômicas e fisiológicas de aguapé e índice de fitorremediação de alface de água cultivados na presença de arsênio, cádmio e chumbo., 2012. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras.

PubChem, 2021. National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atrazine/> (Accessed 26 Jun 2021).

Ribeiro, V. H. V., Coutinho, C. A. I., Alencar, B. T. B., Cabral, M. C., Santos, B. J., Ferreira, A. E., Francino, T. M. D., 2020. Morphoanatomical injuries in *Pistia stratiotes* L. (Araceae) as a result of exposure to clomazone in water. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180519>.

Ribeiro, K. F., Roche, C. M., Castro, D., Rodrigues, L. R., Crossetti, L. O., 2018. Distribution and coexistence patterns of phytoplankton in subtropical shallow lakes at the role of niche based and spatial process. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3539-6>.

Rigotto, R. M., Vasconcelos, P. D., Rocha, M. M., 2014. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311XPE020714>.

Rolon, S. A., Maltichik, L., 2006. Environmental factors as predictors of aquatic macrophyte richness and composition in wetlands of southern Brazil. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1364-1>.

Salazar, J. M. T., Giraldo, Y. M., Serna, O. D. M., 2018. Efectos en el nivel fotosintético en tres especies de plantas acuáticas sometidas a un tratamiento con agua residual de origen minero. <https://doi.org/10.17151/bccm.2018.22.1.3>.

Sarkar, S., Bernardes, J. D., Keeley, J., Mohring, N., Jansen, K., 2021. The use of pesticides in developing countries and their impact on health and the right to food. <http://dx.doi.org/10.2861/28995>.

Salisbury, F. B., Ross, C. W., 2012. Fisiologia das plantas, 4a. ed., Cengage Learning.

Santos, S. B. F., Azevedo, A. A., 2007. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. <https://www.seer.ufrgs.br/rbrasbioci/article/viewFile/115656/62940/> (Acesso 10 de janeiro 2021).

Sene, L., Converti, A., Secchi, G. A., Cassia, R., Garcia, S., 2010. New aspects on atrazine biodegradation. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000200030>.

SciRAP, 2021. Science in Risk Assessment and Policy.

<http://scirap.org/Page/Index/44d2dba9-490a-4c66-9b9c-98e32bfc026a/evaluate-reliability-relevance/> (Accessed 9 Jul 2021).

- Scherer, E. R., Vargas, L., 2005. Como funcionam os herbicidas: da biologia a aplicação. <https://www.embrapa.br/documents/1355291/12492345/Como+funcionam+os+herbicidas/954b0416-031d-4764-a703-14d9b28b178e?version=1.0> (Acesso 11 de novembro 2021).
- SEVS/SES, 2010. Centro de Vigilância em Saúde da Secretaria de Saúde. Secretaria Estadual da Saúde. <https://www.yumpu.com/pt/document/read/32097155/levantamento-do-uso-e-da-criticidade-dos-agrotoxicos-usados-no/> (Acesso 12 de maio 2019).
- Silva, O. R. D., Avila, A. L., Agostinetto, D., Dalmagro, T., Oliveira, E., Zanella, R., Noldin, J. A., 2009. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000900001>.
- Solomon, K. R., Carr, J. A., Preez, D. L. H., Giesy, J. P., Kendall, R. J., Smith, E. E., Kraak, G. J., 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. <https://doi.org/10.1080/10408440802116496>.
- Sunohara. Y., Matsumoto, H., 2004. Oxidative injury induced by the herbicide quinclorac on *Echinochloa oryzicola* Vasin and the involvement of antioxidative ability in its highly selective action in grass species. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.005>.
- Suresh, K. K., Taejun, H., 2010. Physiological response of *Lemna* species to herbicides and its probable use in toxicity testing. <https://doi.org/10.1007/BF03216512>.
- Srivastava, K., Mishra, K. K., 2009. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.08.001>.
- Streit, N. M., Canterle, L. P., Canto, M. W., Hecktheuer, L. H. H., 2005. As Clorofilas. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300043>.

Tedesco, S. B., Laughinghouse, H. D., 2012. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. <https://doi.org/10.5772/31371>.

Trindade, T. R. C., Pereira, A. S., Albertoni, F. E., Palma-Silva, C., 2010. Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes límnicos do campus carreiros – FURG, Rio Grande, RS.

http://www.cadernos.ecologia.furg.br/images/artigos/37_cleber%20macrofitas.pdf/ (Acesso 10 de Dez 2020).

Westlake, D., 1963. Comparisons of plan! productivity. Biol. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1963.tb00788.x>.

Supplementary Material

Table S1. The aqueous atrazine quantification over seven days between water changes.

Nominal Concentration	Measured Concentration
0.02 µg/L	0.37 µg/L ± 0.06
2 µg/L	2.07 µg/L ± 0.27
200 µg/L	112.58 µg/L ± 9.82

Table S2. Physical-chemical parameters of the chronic atrazine test.

Day	Parameter	Control	0.4 (µg/L)	2.1 (µg/L)	113 (µg/L)
0	Temperature (°C)	27.1 – 27.5	24.5 -24.7	24.8 – 25.3	26.1 – 26.6
	Dissolved oxygen (mg/L)	7.6 – 7.7	8.9 – 9.05	8.6 – 8.8	7.3 – 7.7
	pH	6 - 7	6 - 7	6 - 6	6 – 7
2	Temperature (°C)	29.8 – 30.7	33.1 – 32.5	29.7 – 34.2	31.5 – 33.7
	Dissolved oxygen (mg/L)	12.7 – 13.0	10 – 12.2	11.0 – 13.2	9.1 – 10.5
	pH	6 - 7	6 - 7	6 – 6	6 - 7
7	Temperature (°C)	29.0 – 29.2	30.4 – 30.7	31.3 – 32.2	29.6 – 29.9
	Dissolved oxygen (mg/L)	11.8 – 12.4	10.1 – 11.7	7.8 – 8.4	8.7 – 8.8
	pH	6 – 6.5	6.5 - 7	6 – 6.5	6 – 6.5
14	Temperature (°C)	37.1 – 40.8	35.2 – 37.7	35.1 – 36.1	35.3 – 38.7

	Dissolved oxygen (mg/L)	7.9 – 9.6	5.3 – 6.0	7.6 – 8.7	9.5 – 11.0
	pH	6 - 7	6 - 7	6 - 7	6 – 7
	Temperature (°C)	35.4 – 39.9	19.8 – 31.7	29.5 – 31.1	30.0 – 32.7
21	Dissolved oxygen (mg/L)	7.8 - 8.1	10.6 – 11.7	10.9 – 11.5	9.0 – 10.0
	pH	6 - 7	6 - 7	6 - 7	6 – 7

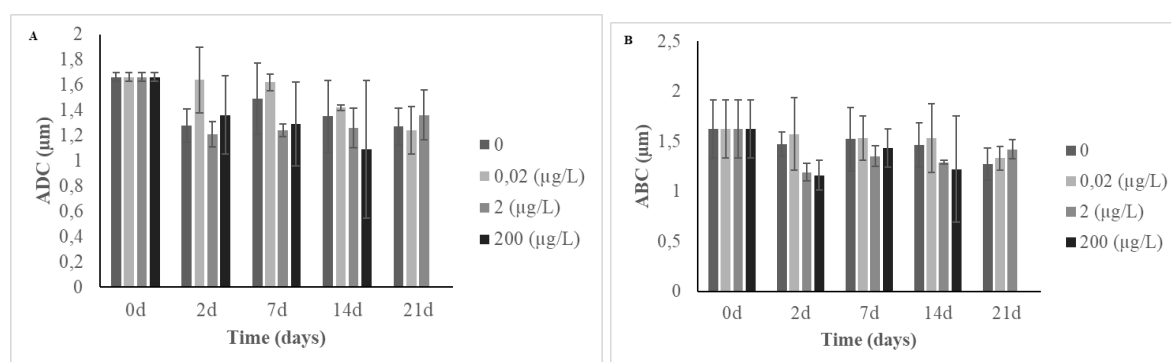


Figure S1-A. Adaxial cuticle thickness (ADC), S1-B. Abaxial cuticle thickness (ABC).

Values presented as mean $\pm$ SD, the plants were exposed for 14 days followed by 7 days of depuration.

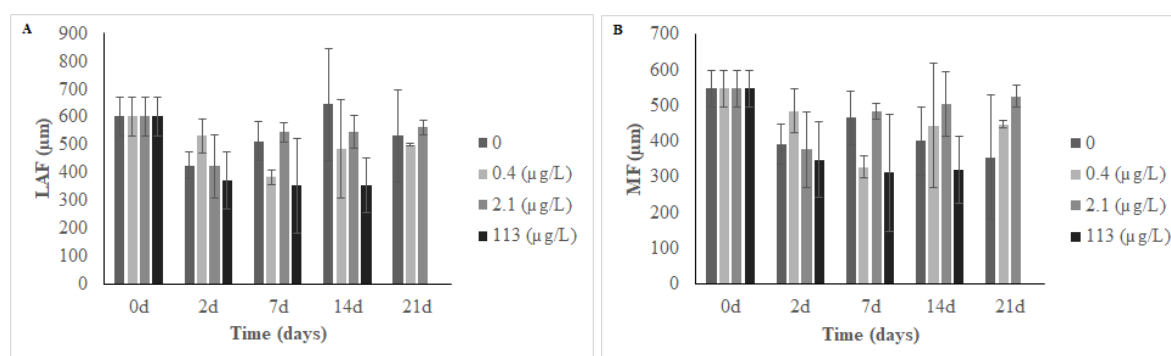


Figure S2-A. Total leaf thickness (LAF), S2-B. The mesophyll thickness (MF). Values presented as mean $\pm$ SD, the plants were exposed for 14 days followed by 7 days of depuration.

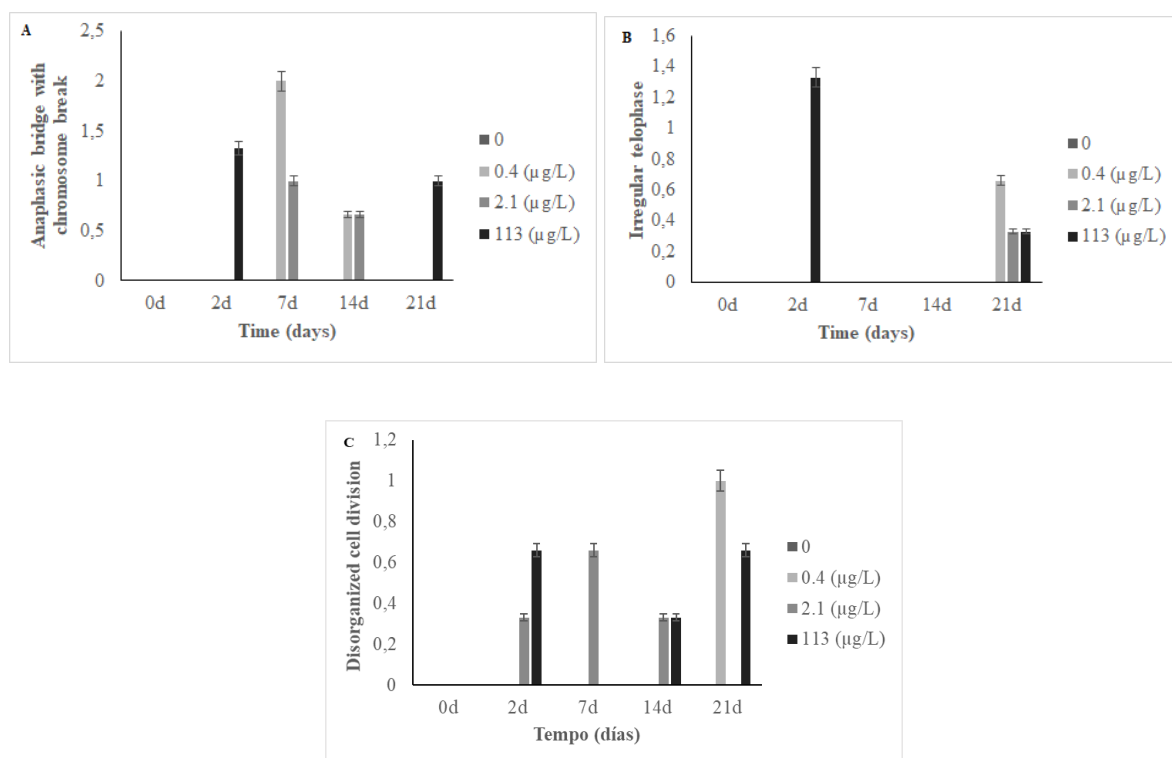


Figure S3. Atrazine effects on root meristematic cells, (A) Anaphasic bridge with chromosome break, (B) Irregular telophase, (C) Disorganized cell division. Values are presented as mean $\pm$ SD, the plants were exposed for 14 days followed by 7 days of depuration.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

À medida que a população mundial aumenta com o passar do tempo, também aumentam as exigências para a produção de alimentos, e com isto também se intensificam a utilização de agrotóxicos, dentre eles os herbicidas os quais deterioram mais os ecossistemas aquáticos de água doce. A atrazina e clomazona são herbicidas amplamente utilizados em alguns países como o Brasil, apesar de sua proibição em diversos países, devido à sua toxicidade. Estes herbicidas apresentam um mecanismo de ação exclusivo nas plantas, já que estas atuam diretamente sobre a fotossíntese, consequentemente uma maior preocupação com os impactos sobre plantas não-alvo do que sobre animais

Os resultados desta pesquisa, juntamente a trabalhos publicados nos últimos anos, demonstram a relevância dos estudos anatômicos, fisiológicos e genotóxicos nas macrófitas aquáticas, já que estas exercem um papel vital nos ecossistemas aquáticos pelo seu importante papel como produtores primários na cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos.

A clomazona apresentou efeitos agudos sobre a concentração de carotenoides, a ação do herbicida interferiu na fotossíntese, levando ao branqueamento das folhas de *E. crassipes*. No entanto, é importante ressaltar que a clomazona foi testada apenas para toxicidade aguda, usando altas concentrações do herbicida, não relevantes ambientalmente. Outro resultado importante foi a ausência de efeitos sobre os carotenoides quando as macrófitas foram expostas às misturas. Destaca-se assim a importância de realizar testes que utilizam a combinações entre os diferentes agrotóxicos, já que estes não são encontrados sozinhos, mas sim combinados entre si o com outros compostos nos ecossistemas aquáticos.

Em relação ao efeito crônico da atrazina, os resultados mostraram uma tendência de efeitos no início da exposição, mas evidenciaram também a capacidade de recuperação da planta, em especial do tecido foliar. Por outro lado, a atrazina se mostrou bastante genotóxica para *E. crassipes*, evidenciada pela alta incidência de micronúcleos, mesmo em concentrações ambientalmente relevante e em concentrações abaixo dos níveis estabelecidos para qualidade em águas superficiais brasileiras. Neste sentido, embora no Brasil a Resolução Conama 357/2005 estabelece os limites máximos permissíveis dos parâmetros de qualidade da água, para garantir a proteção ambiental, padrões estabelecidos com base apenas em dados químicos ou resultados de toxicidade aguda podem não ser suficientes para proteger aos organismos vivos de seus efeitos, indicando a necessidade de refinamento de legislações ambientais vigentes, com vistas a redução ou controle do impacto que causam.

Nesse sentido, se pode sugerir que estudos futuros prossigam na avaliação dos efeitos dos herbicidas regulados no Brasil sobre produtores primários. Todos os parâmetros avaliados neste estudo se mostraram adequados para avaliação de efeitos de herbicidas. Em especial, o nível de pigmentos fotossintéticos nas folhas, e a incidência de células micronucleadas nas raízes, se mostraram excelentes bioindicadores da poluição por herbicidas, atuando como biomarcadores sensíveis a contaminação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTONI, E. F.; PALMA-SILVA, C.; VEIGA, C. C. Estrutura da comunidade de macroinvertebrados associada às macrófitas aquáticas *Nymphoides indica* e *Azolla filliculoides* em dois lagos subtropicais. **Acta - Biológica Leopondensia**, v. 27, p. 137-145, 2005.
- ALBUQUERQUE, F. P.; OLIVEIRA, J. L.; MOSCHINI, V. C.; FERNANDES, L. F. An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. **Science of the Total Environment**, Sao Paulo, p. 1-37, 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias>. Acesso em: 19 de janeiro 2020.
- APPEZZATO, B. G.; GUERREIRO, C. S. M. Anatomia vegetal. 2. ed. Atual Viçosa: Ed. UFV, 2006.
- ARMAS, D. E.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, M. P.; SANTOS, P. A. M. F.; CAMARGO, B. P.; ABAKERLI, B. R. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.
- AVILA, O.; CASIERRA, F.; RIASCOS, D. Contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de caléndula bajo sol y sombra. **Temas agrarios**, v. 17, n. 1, p. 60-71, 2012.
- BARBOSA, A. C.; GENTIL, I. C. Histórico do manejo de macrófitas aquáticas no reservatório Guarapiranga. In: seminário de recursos hídricos da bacia hidrográfica do paraíba do sul: recuperação de áreas degradadas, serviços ambientais e sustentabilidade, 2., 2009.

- BINI, L. M.; THOMAZ, S. M.; SOUZA, D. C. Species richness and diversity of aquatic macrophytes in the upper Paraná River floodplain. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 151, p. 511–25, 2001.
- BORTOLUZZI, E. C.; RHEINIHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R.; COPETTI, A. C. C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de engenharia agrícola ambiental**, v. 10, n. 4, p. 881-887, 2006.
- BUSTAMANTE, S. S. Modelado de espécies invasoras, caso de estudio: perdida del espejo de agua em la laguna de Fuquene por invasion del buchón (*Eichornia crassipes*). Trabajo de Grado Magister en Hidrosistemas, Bogotá, D. C.: Pontificia Universidad Javeriana, 2010.
- BHAT, T. A.; WANI, A. A. Mutagenic effects on meiosis in legumes and a practical case study of *Vicia faba* L. **Chromosome Structure and Aberrations**, p. 2-27, 2017.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Agrotóxicos, 2018. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em: 21 de dez. 2020, 18:12.
- BRASIL. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Poder Executivo, Brasília, DF, 1989.
- BRASIL. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Decreto nº 4.074. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, 2002.
- BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e da outras providências. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 março 2005.
- BRUM, P. R.; ESTEVES, F. A. Dry weight loss and chemical changes in the detritus of three tropical aquatic macrophyte species (*Eleocharis interstincta*, *Nymphaea ampla* and *Potamogeton stenostachys*) during decomposition. **Acta - Limnologica Brasiliensis**, v. 13, n. 1, p. 61–73, 2001.
- CALDAS, S. S. **Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAC E LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea**. Tese (Maestria em Química Tecnologia e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

- CAMBRÓN, V.; HERRERÍAS, Y.; ESPAÑA, M.; SÁENZ, C.; SÁNCHEZ, N.; VARGAS, J. Producción de clorofila en *Pinus pseudostrobus* en etapas juveniles bajo diferentes ambientes de desarrollo. **Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente**, v. 17, n. 2, p. 253-260, 2011.
- CANDELA, E. R. **Comportamiento de atrazina y su relacion con la practica de fertilizacion nitrogenada em el suelo de la Pedania Cañas, Departamento Colón, província de Córdoba**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciencias de la Ingeniería) – Facultad de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales, Argentina, 2016.
- CAPOANE, V.; TIECHER, T.; SCHAEFER, G. L.; CIOTTI, L. H.; DOS SANTOS, D. R. Transferência de nitrogênio e fósforo para águas superficiais em uma bacia hidrográfica com agricultura e produção pecuária intensiva no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 4, p. 647-650, 2015.
- CARLOMAGNO, C. M. **Desarrollo de inmunoensayos para el monitoreo de clomazone y quinclorac en el cultivo de arroz**. Tese (Doctorado en Química) – Universidad de la República, Montevideo Uruguay, 2013.
- CARTER, C. M.; KNAPP, M. D. Comparison of the genetic structure of North and South American populations of a clonal aquatic plant. **Biological Invasions**, v. 3, p. 113-118, 2001.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: Universidade Federal de Lavras, p. 234, 2009.
- CEREJEIRA, J. M.; VIANA, P.; BATISTA, S.; PEREIRA, T.; SILVA, E. VALERIO, M. J.; SILVA, A.; FERREIRA, M.; SILVA, F. A. M. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. **Water Research**, v. 37, p. 1055-1063, 2003.
- COAN, A. I.; SCATENA, V. L.; GIULIETTI, A. M. Anatomia de algumas espécies aquáticas de Eriocaulaceae brasileiras. **Acta Botânica Brasílica**, v. 16, n. 4, p. 371-384, 2002.
- COELHO, C. R. E.; VAZZOLER, H.; LEAL, P. W. Emprego do carvão ativado para remoção de atrazina em água de abastecimento público. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.17 n. 4, p. 421-428, 2012.
- COSTA, J. A.; SOUZA, J. P.; TEIXEIRA, P. A.; NABOUT, C. J.; MELO, C. F. Eutrophication in aquatic ecosystems: a scientometric study. **Acta Limnológica Brasiliensia**, v. 30, p. 1-11, 2018.

- CHAN, K. H.; CHU, W. Atrazine removal by catalytic oxidation processes with or without uv irradiation part II: an analysis of the reaction mechanisms using LC/ESI-tandem mass spectrometry. **Applied Catalysis B: environmental**, v. 58, p. 165-174, 2005.
- CRUZ, A.; FORTES, D.; HERRERA, R.; GARCÍA, M.; GONZÁLEZ, S.; ROMERO, A. Comportamiento de los pigmentos fotosintéticos, según la edad de rebrote después del pastoreo de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 en la estación poco lluviosa. **Revista Cubana de Ciencia Agrícola**, v. 43, n. 2, p. 183-186, 2009.
- CRUZ, M. S. **Interação entre metais e sua toxicidade para o copépode eurialino *Acartia tonsa* Dana 1849**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Toxicologia Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.
- DELLAMATRICE, M. P.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1296-1301, 2014.
- DHIR, B.; KUMAR, R.; MEHTA, D.; SARADHI, P.; SHARMA, A.; SHARMILLA, P. Heavy metal induced physiological alteration in *Salvinia natans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 6, n. 74, p. 1678-1684, 2011.
- DHIR, B.; SRIVASTAVA, S. Heavy metal tolerance in metal hyperaccumulator plant, *Salvinia natans*. S. **Bull Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, p. 720, 2013.
- ESTEVES, F. A. Considerações sobre a aplicação da tipologia de lagos temperados e lagos tropicais. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 11, p. 3-28, 1988.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Comportamento dos herbicidas no ambiente, 2018.
- FAPESP, Agrotóxicos na berlinda. 2018. Disponível em:
<https://revistapesquisa.fapesp.br/agrotoxicos-na-berlinda>. Acesso em: 21 de dez. 2020, 18:54.
- FUENTES, C.; LOZANO, Y. A.; GUERRERO, D. J.; OLARTE, I.; ACEVEDO, B. Comportamiento y destino ambiental de la atrazina en el suelo: detección por HPLC y ¹⁴C de las concentraciones ambientales bajo condiciones controladas y de campo en Saldaña – Tolima. **Agronomía Colombiana**, v. 21, p. 29-48, 2003.
- FREITAS, A. M. J.; WEIRICH, E. C.; BUENO, W. G.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, R. W. Produção de biomassa de macrófitas aquáticas no tratamento de efluente da

- suinocultura. Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente, 28 a 30 de abril. Unioeste, Cascavel – Paraná – Brasil. 2009.
- FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 241-249, 2011.
- GIBSON, G.; KOIFMAN, S. Consumo de agrotóxicos e distribuição temporal da proporção de nascimentos masculinos no Estado do Paraná, Brasil. **Revista Panamericana de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 240-247, 2008.
- GRISI, F. A.; ALVES, J. D.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; BIAGIOTTI, G.; MELO, L. A. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café "Catuaí" e "Siriema" submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 06, p. 1730-1736, 2008.
- GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, n. 2, p. 183-188, 1999.
- GUILLEN, G. R. A.; HANSEN, A. M.; AFFERDEN, V. M. Mineralization of atrazine in agricultural soil: inhibition by nitrogen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, p. 844-850, 2007.
- HANSEN, M. A.; TREVIÑO-QUINTANILLA, G. L.; MÁRQUEZ-PACHECO, H.; VILLADA-CANELA, M.; GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, L. C.; GUILLÉN-GARCÉS, A. R.; HERNÁNDEZ-ANTONIO, A. Atrazina: un herbicida polémico. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 29, p. 65-84, 2013.
- HECKATHORN, S. A.; MUELLER, J. K.; LAGUIDICE, S.; ZHU; BARRETT, T.; BLAIR, B., DONG, Y. Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 9, p. 1312-1318, 2004.
- HURTADO, A.; TORRES, C.; PEÑA, E. J. Identificación de procesos de bioacumulación de cromo en la laguna de Sonso. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, n. 9, p. 69-75, 2010.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo agro 2017. 2020. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html. Acesso em: 12 de maio 2020, 21:54.
- IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry, Global availability of information on agrochemicals. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm>. Acesso em: 7 de junho 2019, 15:44.

- JARAMILLO, S. M. T.; GIRALDO, Y. M.; SERNA, O. D. M. Efectos en el nivel fotosintético en tres especies de plantas acuáticas sometidas a un tratamiento con agua residual de origen minero. *Boletín Científico Centro de Museo de Historia Natural*, v. 22, n. 1, p. 43-57, 2018.
- KONSTANTINO, K. I.; HELA, G. D.; ALBANIS, A. T. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution*, v. 141, p. 555-570, 2006.
- LAGE, P. F. **Alterações ecofisiológicas e estruturais em *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé) no rio Paraíba do Sul e rio Imbé**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro”, Rio de Janeiro, 2008.
- LIMA, M. R. **Atributos de solos e macrófitas aquáticas flutuantes: uma contribuição a sustentabilidade agrícola e ambiental na bacia do rio Irai (PR)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2005.
- MAHMOOD, Q.; ZHENG, P.; SIDDIQI, M.; ISLAM, E.; AZIM, M.; HAYAT, Y. Anatomical studies on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) under the influence of textile wastewater. *Journal of Zhejiang University Science B*. v. 6, n. 10, p. 991–998, 2005.
- MARCHESAN, E.; ZANELLA, R.; AVILA, L. A.; CAMARGO, R. E.; MACHADO, O. S. L.; MACEDO, M. V. R. Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. *Scientia Agricola*, v. 64, n. 2, p. 131-137, 2007.
- MARCHESAN, E.; SARTORI, G. M. S.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACEDO, V. R. M. MARCHEZAN, M. G. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 40, p. 1053-1059, 2010.
- MARCHI, G. M.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. **Embrapa Cerrados**, Planaltina, p. 1-34, 2008.
- MATIOLLI, L. S. Avaliação da citotoxicidade e atividade antioxidante de plantas condimentares. Tese (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual Paulista. v. 8, n. 15, p. 221–243, 2014.
- MAZEN, A.; MAGHRABY, O. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. *Biology Plant*, v. 40, p. 411-417, 1998.

- MIRON, D. S.; SHETTINGER, M. R.; MORSCH, V. M.; BALDISSEROTO, B.; TIerno, M. A.; MORAES, G.; VIEIRA, V. L. P. Effects of herbicides clomazone, quinclorac, and mersulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology Environmental Safety**. v. 6, p. 398-403, 2005.
- MISHRA, K. K.; RAÍ, U. N.; PRAKASH, O. Bioconcentration and Phytotoxicity of Cd in *Eichhornia crassipes*. **Environ Monit Assess**, v. 130, p. 237–243, 2007.
- MOREIRA, A. R.; SILVA, M. A.; SILVA, C. L.; ROCHA, O. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2014.
- NOLDIN, J. A.; HERMES, L. C.; FAY, E. F.; EBERHARDT, D. S.; ROSSI, M. A. Persistência do herbicida clomazone no solo e na água quando aplicado na cultura do arroz irrigado, sistema pré-germinado. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.19, n. 3, p. 401-408, 2001.
- OBIKOR, M. O.; OKONKWO, J. C.; NNABUDE, P. C.; EZEONYEJIAKU, C. D. Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution biomarker: a review. *Journal of Animal Science Advances*, v. 2, n. 1, p. 123-133, 2012.
- OLIVEIRA, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. Biologia e manejo de plantas daninhas. Curitiba, Paraná: **Omnipax**, p. 348, 2011.
- PALMA, P.; PALMA, V.L.; FERNANDES, R.M.; SOARES, A. M. V. M.; BARBOSA, I. R. Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo region of Portugal. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 5, p. 485- 489, 2008.
- PÄTSIKKÄ, E.; KAIRAVUO, M.; SÊRSÊN, F.; ARO, E. M.; TYYSTJÄRVI, E. Excess Copper Predisposes Photosystem II to Photoinhibition in Vivo by Outcompeting Iron and Causing Decrease in Leaf Chlorophyll. **Plant Physiology**. v. 129, p. 1359–1367, 2002.
- PEDRALI, G. Macrófitos aquáticos: técnicas e métodos de estudos. **Estudos de Biologia**, v. 26, p. 5-24, 1990.

- PEREIRA, F. J. **Características anatômicas e fisiológicas de aguapé e índice de fitorremediação de alface de água cultivados na presença de arsênio, cádmio e chumbo**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, 2012.
- PÉREZ, J.; DOMINGUES, I.; SOARES, A. M.; LOUREIRO, S. Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1167- 1175, 2011.
- POMPÊO, M. Monitoramento e manejo de macrofitas aquáticas em reservatórios tropicais brasileiros, São Paulo, Instituto de Biociências da USP, p. 147, 2017.
- POTT, V. J.; POTT, A. Plantas Aquáticas do Pantanal. Embrapa. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal (Corumbá, MS). **Comunicação para transferência de Tecnologia**, p. 404, 2000.
- PRIMEL, E.; ZANELLA, R.; KURZ, M. E.; GONÇALVES, F., Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição teórica e monitoramento. *Química nova*, v, 28, n. 4, p. 605-609, 2005.
- RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E.; EVERT, R. F. *Biologia vegetal*. 8 eds. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 876p. 2014.
- REZANIA, S.; PONRAJ, M.; DIN, M. F. M.; SONGIP, A. R.; SAIRAN, F. M.; CHELLIAPAN, S. The diverse applications of water hyacinth with main focus on sustainable energy and production for new era: an overview. **Renewable Sustainable Energy Reviews**. v. 41, p. 943-954, 2015.
- RIBEIRO, V. H. V.; COUTINHO, C. A. I.; ALENCAR, B. T. B.; CABRAL, M. C.; SANTOS, B. J.; FERREIRA, A. E.; FRANCINO, T. M. D. Morphoanatomical injuries in *Pistia stratiotes* L. (Araceae) as a result of exposure to clomazone in water. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 1-15, 2020.
- RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, P. D.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Revista Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.
- ROLON, S. A.; MALTCHIK, L. Environmental factors as predictors of aquatic macrophyte richness and composition in wetlands of southern Brazil. **Hidrobiologia** 556:221-231, 2006.

- ROLON, S. A.; HOMEM, H.; MALTCHIK, L. Aquatic macrophytes in natural and managed wetlands of Rio Grande do Sul State, southern Brazil. *Acta Limnologica Brasileira*, v. 22, n. 2, p. 133-146, 2010.
- SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W.; *Fisiologia das plantas*, 4a. ed., Cengage Learning, 2012.
- SANTOS, S. B. F.; AZEVEDO, A. A. Aspectos morfoanatomicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. *Revista Brasileira de Biociencias*, v. 5, p. 48-50, 2007.
- SENE, L.; CONVERTI, A.; SECCHI, G. A.; CASSIA, R.; GARCIA, S. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 487-496, 2010.
- SEVS/SES. Centro de Vigilância em Saúde da Secretaria de Saúde. Secretaria Estadual da Saúde. 2010. Disponível em:
<https://www.yumpu.com/pt/document/read/32097155/levantamento-do-uso-e-da-criticidade-dos-agrotoxicos-usados-no>. Acesso em: 12 de maio 2019, 17:49.
- SILVA, O. D. R.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T.; OLIVEIRA, E.; ZANELLA, R.; NOLDIN, J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2383-2389, 2009.
- SOLOMON, K. R.; CARR, J. A.; DU PREEZ, L. H.; GIESY, J. P.; KENDALL, R. J.; SMITH, E. E.; VAN DER KRAAK, G. J. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. **Critical reviews in toxicology**, v. 38, n. 9, p. 721-772, 2008.
- SOUSA, D. J. L. Taxonomia e morfologia das Pontederiaceae do estado da Bahia. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, p. 105, 2014.
- STEPHENSON, G. R.; FERRIS, I. G.; HOLLAND, P. T.; NORDBERG, M. Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 11, p. 2075-2154, 2006.
- TAYLOR, E. J.; MAUND, S. J.; PASCOE, D. Evaluation of a chronic toxicity test using growth of the insect *Chironomus riparius* Meigen. En: Jeffrey, D.W. and B. Maden. eds. *Bioindicators and Environmental management: proceedings*, 6th. International Bioindicators Symposium. Academic, London, UK, p. 343-352, 1991.
- TENBROOK, P. L.; TJEERDEMA, R. S. Comparative actions of clomazone on beta-carotene levels and growth in rice (*Oryza sativa*) and watergrasses (*Echinochloa* spp). **Pest Management Science**, v. 61, p. 567-571, 2005.

- THOMAZ, S. M.; ESTEVES, F. A. Comunidade de macrófitas aquáticas. In: ESTEVES, F. A. (Coord.). Fundamentos de limnologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciencia, p. 461-521, 2001.
- TRINDADE, T. R. C.; PEREIRA, A. S.; ALBERTONI, F. E.; PALMA-SILVA, C. Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes límnicos do campus carreiros – FURG, Rio Grande, RS. **Cadernos de Ecologia Aquática**, v. 5, n. 2, p. 1-22, 2010.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-analytical-methods/ecm-clomazone-water-mrid-44348407>. Acesso em: 09 de junho 2019.
- VAN SCOY, A. R.; TJEERDEMA, R. S.; Environmental fate and toxicology of clomazone. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 229, p. 35-49, 2014.
- VÖRÖSMARTY, C. J.; GREEN, P.; SALISBURY, J.; LAMMERS, R. B. Global Water Resources: Vulnerability from Climate Change and Population Growth. **Science**, v. 289, p. 284-288, 2000.
- WAN, M. T.; BUDAY, C.; SCHROEDER, G.; KUO, J.; PASTERNAK, J. Toxicity to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus tshawytscha*, and *Rana catesbeiana* of Atrazine, Metolachlor, Simazine, and Their Formulated Products. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, p. 52-58, 2006.
- WETZEL, R. G. Limnologia. 2. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 1129, 1993.
- ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; CONÇALVES, F. F.; MARTINS, M. L.; ADAIME, M. B.; MARCHESAN, E.; MACHADO, S. L. O. Study of the degradation of the herbicide clomazone in distilled and in irrigated rice field waters using HPLC-DAD and GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 987-995, 2008.