



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Respostas dos organismos marinhos à azoxistrobina e à sua formulação comercial Ortiva®.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Miguel Pardal (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Isabel Lopes (Universidade de Aveiro)

Cristiano Rafael Alves Gante

2015

## **Agradecimentos**

Este trabalho não foi resultado de mero esforço individual, mas sim do contributo de diversas pessoas. Às quais, eu deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Pardal, pelo apoio, encorajamento, amizade, sabedoria, exigência, mas acima de tudo, por me ter deixado entrar num excelente grupo de trabalho. Um muito obrigado.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Isabel Lopes, pela simpatia, apoio, amizade, paciência, ajuda e disponibilidade ao longo da realização deste trabalho.

À Mestre Elsa Rodrigues, pelo acompanhamento do trabalho, paciência, disponibilidade, ajuda e também pelas críticas, correcções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao Professor Doutor João Loureiro, pela instrução e utilização do equipamento de citometria de fluxo.

À Professora Doutora Matilde Moreira dos Santos, pelo apoio dado nos ensaios de Microtox<sup>®</sup> e na interpretação de resultados.

Ao Doutor Ricardo Calado, Investigador Principal da Universidade de Aveiro, pela gentileza de oferecer as culturas de microalgas.

A todos os membros do grupo de trabalho que conheci, pela forma carinhosa como fui recebido, pela convivência diária, pelo incansável acompanhamento, pelo apoio, ajuda e incentivo.

Aos colegas de mestrado e de licenciatura, por toda a amizade, conselhos, apoio e companhia, o meu muito obrigado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Um obrigado especial para os pais pelo incentivo, paciência, amizade e apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

Para o meu irmão Cláudio.

<b>Índice</b>	
<b>Resumo</b>	I
<b>Abstract</b>	III
<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	1
1.1. Substância ativa azoxistrobina	3
1.2. Formulações comerciais	6
1.3. Espécies marinhas ou estuarinas	7
1.4. Objectivos	9
<b>Capítulo 2 – Material e Métodos</b>	10
2.1. Pesticida	11
2.2. Ensaios ecotoxicológicos	11
2.2.1. Espécies	12
2.2.2. Ensaio de inibição de bioluminescência com <i>Vibrio fischeri</i>	12
2.2.3. Ensaio de inibição do crescimento com microalgas	13
2.2.4. Ensaio de inibição do crescimento com macroalgas	15
2.2.5. Ensaio de letalidade com rotíferos	17
2.2.6. Ensaio de letalidade com artrópodes	18
2.2.7. Ensaio de letalidade com gastrópodes	19
2.3. Análise estatística	22
<b>Capítulo 3 – Resultados</b>	23
3.1. Critérios de validade	24
3.2. Parâmetros físicos e químicos	24
3.3. Ensaios ecotoxicológicos	25
3.4. Cálculo do risco	27
<b>Capítulo 4 – Discussão</b>	29
<b>Capítulo 5 – Conclusão</b>	35
<b>Referências Bibliográficas</b>	38

## Resumo

O aumento da aplicação extensiva de pesticidas na agricultura conduz à contaminação nos ecossistemas aquáticos. A azoxistrobina (AZX) é um fungicida de largo espectro que permite controlar quatro classes de fungos através da inibição da respiração mitocondrial. A toxicidade da substância ativa e da sua formulação comercial para organismos não-alvo marinhos/estuarinos é muito pouco conhecida, apesar deste compartimento aquático ser um potencial receptor deste pesticida devido às escorrências oriundas de campos agrícolas localizados nas margens de rios. Deste modo, o principal objetivo deste trabalho foi determinar e comparar a toxicidade do ingrediente ativo azoxistrobina e da sua formulação comercial Ortiva<sup>®</sup> para biota marinho/estuarino. Para atingir este objetivo foram colocadas duas hipóteses: (i) existe uma elevada variabilidade na sensibilidade de espécies marinhas/estuarinas a este compostos e (ii) os dois compostos em questão apresentam toxicidade diferencial para as espécies marinhas/estuarinas.

A avaliação da toxicidade destes compostos foi determinada através da realização de ensaios ecotoxicológicos de curta duração com sete espécies marinhas/estuarinas pertencentes a diferentes grupos taxonómicos e funcionais: a bactéria *Vibrio fischeri*, as microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Phaeodactylum tricornutum*, a macroalga *Ulva* sp., o gastrópode *Gibbula umbilicalis*, o rotífero *Brachionus plicatilis* e o artrópode *Artemia franciscana*. O gastrópode *G. umbilicalis* foi a espécie mais sensível [LC<sub>50,96h</sub>, mortalidade: 13,2 (10,4-15,9) µg/L e 17,0 (12,7 – 22,0) µg/L para AZX e Ortiva<sup>®</sup>, respectivamente] e a bactéria *V. fischeri* foi a mais tolerante [EC<sub>50,5min</sub>, produção de bioluminescência: 10,3 (8,68-12,1) mg/L e 1,23 (0,94-1,60) g/L para AZX e Ortiva<sup>®</sup>, correspondentemente] aos dois compostos testados. No geral, as espécies testadas apresentaram maior sensibilidade ao ingrediente ativo AZX do que à sua formulação

comercial Ortiva<sup>®</sup>, embora não fosse possível determinar os efeitos tóxicos dos dois compostos na macroalga *Ulva* sp. e no rotífero *B. plicatilis*.

Foi ainda calculado o valor de quociente de risco para azoxistrobina que revelou ser muito alto. Os resultados obtidos neste estudo confirmam que a AZX e a sua formulação comercial são altamente tóxicas para os organismos marinhos/estuarinos. Estes resultados poderão contribuir para o estabelecimento de limites máximos de AZX no ambiente, levando a um uso mais sustentável do pesticida e a uma maior proteção dos ecossistemas receptores.

**Palavras-chave:** Azoxistrobina, Ortiva<sup>®</sup>, toxicidade, biota marinho/estuarino

## Abstract

The increase of extensive application of pesticides in agriculture leads to contamination in aquatic ecosystems. Azoxystrobin (AZX) is a broad-spectrum fungicide that enables to control of four classes of fungi by inhibiting mitochondrial respiration. The toxicity of the active substance and its commercial formulation for non-target marine/estuarine organisms is poorly studied, despite the fact that this aquatic compartment constitutes a potential recipient of this pesticide due to run-off coming from agricultural fields located on the margins of rivers. Accordingly, the main objective of this work was to determine and compare the toxicity of the active ingredient azoxystrobin and its commercial formulation Ortiva<sup>®</sup> for marine/estuarine biota. To achieve this goal two hypotheses were formulated: (i) there is a high variability in sensitivity of marine/estuarine species to these compounds and (ii) the two compounds in question exhibit differential toxicity to marine/estuarine species.

The assessment of the toxicity of these compounds was determined by performing ecotoxicological short-term assays with seven marine/estuarine species: bacteria *Vibrio fischeri*, microalgae *Nannochloropsis gaditana* and *Phaeodactylum tricorutum*, macroalgae *Ulva* sp., gastropod *Gibbula umbilicalis*, rotifer *Brachionus plicatilis* and arthropod *Artemia franciscana*. The gastropod was the most sensitive species [LC<sub>50,96h</sub>, mortality: 13,2 (10,4-15,9) µg/L and 17,0 (12,7 – 22,0) µg/L to AZX and Ortiva<sup>®</sup>, respectively] while the bacteria the most tolerant one [EC<sub>50,5min</sub>, bioluminescence production: 10,3 (8,68-12,1) mg/L and 1,23 (0,94-1,60) g/L for AZX and Ortiva<sup>®</sup>, respectively] to the two tested compounds. Overall, the tested species showed higher sensitivity to the active ingredient AZX than to its commercial formulation Ortiva<sup>®</sup>, although it was not possible to determine the toxic effects of the two compounds in macroalga *Ulva* sp. and rotifer *B. plicatilis*.

It was also calculated the risk quotient value for azoxystrobin that turned out to be very high. The results obtained in this study confirm that AZX and its commercial formulation are highly toxic to marine/estuarine organisms. These results may contribute to the establishment of maximum available limits of AZX in the environment, leading to a more sustainable use of pesticides and a higher protection of the receiving ecosystems.

**Keywords:** azoxystrobin, Ortiva<sup>®</sup>, toxicity, marine/estuarine biota



Capítulo 1

Introdução

## 1. Introdução

Os pesticidas são mundialmente utilizados no controlo de pragas, de patogénicos e de ervas daninhas, e na produção de comida (Aktar *et al.*, 2009). Entre as substâncias antropogénicas produzidas atualmente, os pesticidas são amplamente detetados nos ecossistemas marinhos e de água doce (EEA, 2011; Kumar *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2012). Esta ocorrência está relacionada com o facto de estes compostos apresentarem um enorme perigo de escoamento e de lixiviação dos campos agrícolas para os ecossistemas aquáticos que lhes são adjacentes. Uma vez nestes ecossistemas, podem provocar efeitos adversos em organismos não alvo, que por sua vez poderão bioacumular e promover a transferência destes compostos ao longo das cadeias alimentares e, conseqüentemente prejudicar também a saúde humana (Kelly *et al.*, 2007). Uma vez lançados no ambiente, os pesticidas ficam sujeitos a uma imensa multiplicidade de reações complexas e de influência de vários factores bióticos e abióticos que podem determinar o seu comportamento, destino e toxicidade. Pelo que o estudo e a compreensão dos diversos efeitos negativos que estes compostos podem provocar nos ecossistemas são fundamentais de forma a minimizar os impactos provocados pelo uso intensivo de pesticidas na agricultura.

A agricultura é o sector que mais utiliza pesticidas de modo a proteger a vitalidade das plantas, garantirem rendimentos elevados e preservam a qualidade dos produtos vegetais. É estimado que o consumo a nível mundial de pesticidas seja de aproximadamente 2 biliões de toneladas por ano, dos quais 45% são consumidos só na Europa (De *et al.*, 2014).

Em Portugal, as culturas irrigadas, como o cultivo de arroz, são predominantes, pelo que se estima que o perigo de contaminação dos sistemas aquáticos por pesticidas usados na agricultura portuguesa seja elevado. Entre os pesticidas, os fungicidas são os

mais amplamente usados na agricultura. Em Portugal, os fungicidas são o tipo de produto mais vendido (68% do total de vendas de pesticidas em 2012), seguido dos herbicidas (14% do total de vendas de pesticidas em 2012) (REA, 2014).

### **1.1. Substância ativa azoxistrobina**

Atualmente, os fungicidas da família química das estrobilurinas representam um dos grupos mais importantes de pesticidas a nível mundial que são utilizados para controlar os fungos patogénicos das colheitas. Em 1999, as vendas de estrobilurinas somaram US \$ 620 milhões em todo o mundo (Bartlett *et al.*, 2002) e aumentaram para US \$ 1,636 mil milhões até 2007 (Stanley Alliance Info-Tech, 2011). Da família química de estrobilurinas, a azoxistrobina é o fungicida mais usado mundialmente, tendo entrado no mercado em 1996 (Barlett *et al.*, 2002).

A azoxistrobina possui um largo espectro de acção que permite controlar quatro classes de fungos (Ascomycota, Deuteromycota, Basidiomycota e Oomycota) (Barlett *et al.*, 2001). O seu modo de acção bioquímico está focado na transferência de electrões que ocorre na cadeia respiratória mitocondrial. A azoxistrobina liga-se fortemente ao local reduzido da ubihidroquinona, local-Qo do composto III do complexo bc1, impedindo a transferência de electrões entre o citocromo b e o citocromo c1 da cadeia respiratória. Este procedimento impede a produção de ATP, reduzindo grandemente a produção aeróbica de energia e, reduzindo deste modo o crescimento do fungo (Barlett *et al.*, 2002). Mais ainda, a inibição da respiração mitocondrial provoca a fuga dos electrões da cadeia respiratória mitocondrial, induzindo o stress oxidativo das células (Barlett *et al.*, 2002; Garanzini & Menone, 2015; Zhang *et al.*, 2010). A azoxistrobina também enfraquece o sistema de defesa antioxidante, ao mesmo tempo que promove a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), aumentando, assim os danos do stress oxidativo

nos organismos (Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013). É então, evidente que este fungicida apresenta duas vias (a escassez de ATP e o stress oxidativo) de controlo de fungos patogénicos. Como o modo de ação da azoxistrobina não é específica, esta pode provocar efeitos adversos noutros organismos eucariótas para além dos fungos alvos.

A substância ativa azoxistrobina apresenta diversos comportamentos e múltiplas vias de entrada e distribuição nos vários compartimentos do meio ambiente, que dependem das suas propriedades físico-químicas e das matrizes onde é libertada. Esta substância ativa apresenta uma baixa taxa de volatilização de  $7,3 \times 10^{-14}$  atm m<sup>3</sup>/mol (Constante da Lei de Henry, a 20°C), e uma baixa mobilidade no solo, é pouco solúvel em água (6,7 mg/L, 20°C), sendo estável à hidrólise (pH 4–9) (EFSA, 2010; IUPAC, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013; US-EPA, 1997). Tanto em água como nos solos, a azoxistrobina pode fotodegradar perante a irradiação dos raios solares e da radiação ultravioleta (UV) (Ghosh & Singh, 2009). Ghosh e Singh (2009) também observaram que azoxistrobina é mais persistente em solos aeróbios do que em solos anaeróbios. Em condições laboratoriais, a azoxistrobina exibiu elevada persistência durante as incubações com sedimentos naturais aeróbicos, formando o metabolito principal R234886 (EFSA, 2010). Num estudo realizado numa lagoa ao ar livre, a azoxistrobina foi rapidamente absorvida nos sedimentos e posteriormente degradada na coluna de água, apresentando um tempo médio de dissociação (DT<sub>50</sub>, tempo em que metade do pesticida dissipou) calculado de cerca de 13 dias (EFSA, 2010). O risco médio de lixiviação da azoxistrobina é médio a alto, enquanto na areia marinha, nos depósitos de morena e nos depósitos de argila de sedimentos marinhos, o seu risco médio de lixiviação é médio (Stenrød *et al.*, 2008).

À escala mundial, foram realizados estudos nas exposições naturais de azoxistrobina em amostras de águas. No continente americano, em treze estados dos Estados Unidos, das amostras de águas recolhidas em 29 cursos de águas, o valor mais elevado medido da azoxistrobina dissolvida foi de 1,13 µg/L (Battaglin *et al.*, 2011), e no Brasil, o valor máximo medido é cerca de 0,19 µg/L em amostras de águas subterrâneas e superficiais de "Platô de Neópolis" (Filho *et al.*, 2010). No continente europeu, os valores máximos medidos são mais elevados em comparação com os do continente americano. Em França, Dinamarca e Alemanha, a concentração máxima de azoxistrobina obtida nas amostras de água de cada país é cerca de 29,70; 1,40 e 11,10 µg/L (Berenzen *et al.*, 2005; Jørgensen *et al.*, 2012; Liess & von der Ohe, 2005), respetivamente. Estas concentrações ambientais estão acima das concentrações máximas aceitáveis no ambiente, o que pode constituir um risco elevado para os organismos aquáticos mais sensíveis (Rodrigues *et al.*, 2013). Até ao momento, não foram encontrados valores relativos às concentrações ambientais de azoxistrobina medidas em águas superficiais de sistemas marinhos e estuarinos, publicados na literatura científica.

A contaminação das águas depende da natureza dos pesticidas (solubilidade em água, hidrofobia), das propriedades do solo, das condições climáticas, da paisagem e também da distância desde o local de aplicação ao curso de água (Cerejeira *et al.*, 2003; Donald *et al.*, 2007; Gilliom, 2007). O transporte da azoxistrobina para o curso de água pode ser efectuada por eventos de enxurradas ou lixiviação causadas por chuvas fortes, logo após a aplicação do pesticida nas colheitas. Nos corpos de água, a azoxistrobina eventualmente dissipa-se por absorção nos sedimentos e, subsequente, degradação microbiana, com a formação de metabolitos, que geralmente são menos tóxicos que o composto original (Barlett *et al.*, 2002). A azoxistrobina tem baixa lipofilicidade (log

$P_{ow} = 2.5$ ), o que dificulta a sua absorção pelos organismos aquáticos (Barlett *et al.*, 2002). Por conseguinte, os organismos aquáticos podem ser afectados quer por exposição de curta ou longa duração nas bacias hidrográficas, a pesticidas dissolvidos ou absorvidos a partículas que se encontram em suspensão ou no sedimento (Frankart *et al.*, 2002). Consequentemente, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, 2010) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA, 1997) instruem o uso de azoxistrobina em colheitas localizadas fora do alcance de lagos, cursos de água, lagoas, mangais e estuários.

Para estudar e compreender os efeitos adversos da azoxistrobina no biota, vários investigadores realizaram testes de toxicidade com diversas espécies. Estes estudos revelaram que a azoxistrobina apresenta uma baixa toxicidade aguda e crónica para humanos, aves, mamíferos e abelhas, mas é altamente tóxica para peixes e invertebrados de água doce, e peixes marinhos/estuarinos, e é muito alta para os invertebrados marinhos/estuarinos (Barlett *et al.*, 2002; EFSA, 2010; US-EPA, 1997). Contudo, dos testes de toxicidade aguda realizados em organismos aquáticos, encontram-se mais trabalhos publicados com os organismos de água doce do que a organismos marinhos/estuarinos, havendo ainda uma falha importante do conhecimento relativamente ao último grupo de organismos (EFSA, 2010; Rodrigues *et al.*, 2013).

## **1.2. Formulações comerciais**

Os pesticidas que usamos no dia-a-dia, são denominados formulações comerciais. A formulação comercial é constituída por outros compostos para além da substância ativa, que podem ser ingredientes inertes ou surfatantes. Estes últimos atuam como conservantes, emulsionantes e solubilizantes, ajudando muitas vezes a substância ativa a chegar ao local alvo. No entanto, estes compostos podem contribuir para a toxicidade

geral da formulação comercial do pesticida, seja pela sua toxicidade intrínseca ou pela sua influência na toxicidade apresentada pelo ingrediente ativo (Carmichael, 2005; Caux *et al.*, 1996; Cox & Sorgan, 2006; Hourmant *et al.*, 2009; Lipok *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2009). Os ingredientes inertes das formulações comerciais também desempenham um papel decisivo na determinação do comportamento, destino e toxicologia ambiental da substância ativa.

As legislações internacionais relacionadas com a regulamentação da comercialização e uso de pesticidas focam principalmente nas substâncias ativas em vez das suas formulações. No entanto, são as formulações comerciais que são aplicadas e libertadas, pelo que é relevante a determinação e caracterização da toxicidade das formulações comerciais para se proceder à avaliação dos riscos ecológicos. A escassez desta informação pode promover a subestimação do risco associado às formulações comerciais. Logo a realização de uma avaliação da substância ativa e da sua formulação comercial oferece então uma análise mais completa dos riscos associados à exposição de pesticidas no ambiente.

A substância ativa azoxistrobina é componente de diversas formulações comerciais, como por exemplo, Abound<sup>®</sup>, Amistar<sup>®</sup>, Ortiva<sup>®</sup>, Piori<sup>®</sup>, Quadris<sup>®</sup> e Quilt<sup>®</sup>. A formulação comercial que foi selecionada para a realização deste estudo é o Ortiva<sup>®</sup>, que é muito usado no cultivo de cereais, como o arroz.

### **1.3. Espécies marinhas ou estuarinas**

Na região do Baixo Mondego (Portugal) o fungicida Ortiva<sup>®</sup> é comumente utilizado na cultura do arroz para combater doenças como a piriculariose (DRAPC, 2009; ABOFHBM, 2012). Por conseguinte, é espectável que as comunidades aquáticas do estuário do rio Mondego possam estar expostas a este pesticida, uma vez que este

pode ser arrastado dos campos agrícolas, onde é aplicado, para o rio Mondego, quer por processos de lixiviação quer por processos de enxurradas superficiais que possam ocorrer após a aplicação do pesticida nos campos adjacentes às margens do rio Mondego. Uma vez no sistema lótico o pesticida pode ser transportado ao longo de grandes distâncias, principalmente ligado a partículas que se encontram em suspensão na coluna de água. Uma vez chegadas ao estuário estas partículas tendem a depositar-se nos sedimentos.

Como o estuário é uma zona de berçário e de forrageamento para inúmeras espécies de peixes e invertebrados marinhos/estuarinos de muita importância comercial e para fins recreativos, este pesticida pode constituir um risco para estas espécies. O estuário é então considerado como uma zona crítica a contaminação por parte dos pesticidas, devido à proximidade das fontes de exposição a pesticidas e por estes não se dissiparem tão rapidamente como em zonas costeiras (Bocquené & Franco, 2005).

Devido ao fundamento anterior, ao modo de ação da azoxistrobina, à alta sensibilidade dos organismos marinhos pela azoxistrobina e à falta de utilização dos organismos marinhos nos ensaios de toxicidade, selecionou-se espécies marinhas para a realização deste estudo. Foi escolhida uma grande diversidade de espécies de diferentes filogenias e de níveis tróficos distintos (decompositores, produtores e consumidores primários). As bactérias marinhas *Vibrio fischeri* foram selecionadas para a realização deste estudo como decompositores, por serem organismos procariontes que possuem respiração aeróbia, e esta está associada à sua produção de bioluminescência (Dunn, 2012), facilitando a medição dos efeitos de toxicidade. A azoxistrobina vai atuar nestas vias impedindo a produção e emissão de luz pelas bactérias, tendo em consideração que as bactérias procariontes de facto não possuem mitocôndrias como os seres eucariontes. Os produtores unicelulares deste estudo são representados pelas microalgas marinhas



*Nannochloropsis gaditana* e *Phaeodactylum tricornutum*. Por pertencerem à base de múltiplas cadeias alimentares, como fitoplâncton. As macroalgas do género *Ulva* foram selecionadas para representarem os produtores do grupo das macroalgas. Dado a sua importância como abrigo e alimento a organismos menores, e por se reproduzirem assexuadamente. Os animais testados, *Brachionus plicatilis*, *Artemia franciscana* e *Gibbula umbilicalis* (consumidores primários) foram-no nas suas fases iniciais de vida (larvas ou juvenis), por serem mais sensíveis a xenobióticos, que as suas formas adultas (Mohammed, 2013). Os juvenis também são fáceis de produzir, de manusear e de manter em cultura, facilitando os ensaios de toxicidade a baixo custo e menor duração (Mohammed, 2013; Zhu *et al.*, 2013). A avaliação dos pesticidas em sistemas marinhos e estuarinos é importante porque o destino ambiental dos pesticidas pode ser influenciado por fatores como a salinidade, pH, solubilidade de oxigénio e outros fatores físico-químicos que diferem entre estes sistemas e os sistemas de água doce (DeLorenzo & Fulton, 2012).

#### **1.4. Objectivos**

O objetivo principal deste estudo é determinar e comparar os efeitos adversos provocados pela substância ativa azoxistrobina e pela sua formulação comercial Ortiva<sup>®</sup> em espécies marinhas/estuarinas. São colocadas duas hipóteses: (i) há uma grande variabilidade interespecífica na sensibilidade a AZX e Ortiva<sup>®</sup> e (ii) o ingrediente ativo AZX e a formulação comercial Ortiva<sup>®</sup> apresentam diferentes níveis de toxicidade para os organismos marinhos/estuarinos.

Este estudo é relevante, uma vez que irá preencher as lacunas dos conhecimentos científicos sobre a toxicidade da azoxistrobina, dando assim um contributo para futuramente se estabelecerem limites máximos da azoxistrobina no ambiente aquático.

Capítulo 2

Material e Métodos

## 2. Material e métodos

### 2.1. Pesticida

A sua substância ativa, azoxistrobina-AZX (PESTANAL; pureza de 99,9%) foi adquirida à empresa Sigma-Aldrich (Missouri, EUA) e a sua formulação comercial Ortiva<sup>®</sup> à empresa Syngenta<sup>®</sup> (Lisboa, Portugal) sob a forma de suspensão concentrada com 250g/L (23,1%) de azoxistrobina.

Para a AZX e o Ortiva<sup>®</sup> produziram-se soluções stock e soluções de trabalho respetivamente, a partir das quais foram feitas diluições de modo a obter as concentrações a testar nos vários ensaios ecotoxicológicos. Uma vez que a substância ativa AZX não é solúvel em água, foi efetuada uma solução stock de 200 mg/L no solvente acetona, para tal, adicionou-se 0,2 mg de AZX em 1 mL de acetona. Esta solução foi mantida a -18°C até à sua utilização nos ensaios ecotoxicológicos. A formulação comercial Ortiva<sup>®</sup> é solúvel em água, pelo que as soluções de trabalho (para todos os ensaios, excepto o da macroalga, as concentrações foram diferentes: 5 g/L para *Vibrio fisheri* e *Phaeodactylum tricornutum*, 2 g/L para *Brachionus plicatilis*, 1 g/L para *Nannochloropsis gaditana*, 200 mg/L para *Artemia franciscana* e *Gibbula umbilicalis*) foram efetuadas no dia de realização de cada ensaio ecotoxicológico através da adição directa de Ortiva<sup>®</sup> ao respetivo meio de ensaio.

### 2.2. Ensaio ecotoxicológicos

Uma vez que a azoxistrobina é estável em água (US-EPA, 1997), realizaram-se ensaios ecotoxicológicos estáticos, *id est* não houve renovação do meio durante todo o período de exposição dos organismos. Os seguintes parâmetros físico-químicos foram

medidos, utilizando uma sonda multiparamétrica (Hach HQ30d, EUA), em todos os controlos e em todas as concentrações de AZX e Ortiva<sup>®</sup> realizados: oxigénio dissolvido, pH, salinidade. No final dos ensaios, todo o material exposto a AZX ou Ortiva<sup>®</sup> foi lavado e descontaminado durante 6 horas através da sua imersão numa solução de detergente Extran<sup>®</sup> MA 01 a 2% (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) (Rodrigues *et al.*, 2013). Todos os resíduos gerados durante os ensaios ecotoxicológicos foram recolhidos por uma empresa especializada no tratamento deste tipo de resíduos.

### **2.2.1. Espécies**

A avaliação da toxicidade de azoxistrobina (como ingrediente ativo e formulação comercial) foi determinada através da realização de ensaios ecotoxicológicos de curta duração com sete espécies marinhas/estuarinas representativas de diferentes grupos taxonómicos e funcionais de modo a obter um intervalo abrangente e representativo de sensibilidades aos compostos estudados: a bactéria *Vibrio fischeri* (decompositor); as microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Phaeodactylum tricornutum* (produtores); a macroalga *Ulva* spp. (produtor); o gastrópode *Gibbula umbilicalis* (consumidor primário); o rotífero *Brachionus plicatilis* (consumidor primário) e o artrópode *Artemia franciscana* (consumidor primário) (Tabela I).

### **2.2.2. Ensaio de inibição de bioluminescência com *Vibrio fischeri***

A bactéria marinha *V. fischeri* foi adquirida à empresa Quincomer Inc. (Lisboa, Portugal) sob a forma liofilizada (sendo reconstituídas no dia em que foram utilizadas nos ensaios), assim como a solução de reconstituição das bactérias, a solução de ajuste osmótico e o meio de diluição. O ensaio pretendeu avaliar o efeito dos compostos

químicos em estudo na inibição de produção de bioluminescência por esta bactéria e foi realizado de acordo com o protocolo Basic Test 81.9% (Azur, 1998). A bactéria foi exposta a sete concentrações nominais da substância ativa AZX e da formulação comercial Ortiva<sup>®</sup> (as condições de exposição dos dois ensaios encontram-se descritos na Tabela I) e a dois controlos: controlo negativo (que consistiu no meio de diluição) e controlo solvente (só realizado para o ensaio com AZX e correspondeu à concentração máxima de acetona usada para dissolver a AZX; neste ensaio, consistiu em 50 µL de acetona em 10 mL de meio de diluição). As concentrações testadas de AZX foram obtidas a partir da diluição de uma solução de 20 mg/L (em meio de diluição) produzida a partir da respetiva solução stock de 200 mg/L da AZX. A luminescência emitida por *V. fisheri* foi medida antes da exposição e após 5 minutos de exposição aos compostos em estudo, utilizando o equipamento Microtox Model 500 Analyser acoplado ao Microtox Omni Windows *software* (Modern Water, Reino Unido).

### **2.2.3. Ensaio de inibição do crescimento com microalgas**

Foram selecionadas duas espécies de microalgas marinhas pertencentes a dois Filos: *Nannochloropsis gaditana* (Ochrophyta) e *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta). Estas espécies foram mantidas em culturas de laboratório numa incubadora Binder KBW400 (Tuttlingen, Alemanha), a 20°C, sob luz contínua (intensidade: 3300 lux) e em água marinha artificial, obtida através da adição de sal marinho artificial (Tropic Marin Salt Tropical, Marine Centre, Alemanha) a água ultra-pura (Milli-Q Biocel System, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), à qual foi adicionado o suplemento “goldmedium” duplamente concentrado numa proporção de 10 mL de suplemento para 1 L de meio (AQUALGAE, Espanha).

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados durante a fase de crescimento exponencial das culturas de microalgas de acordo com o protocolo OECD 201 (2006) (por favor, consultar a Tabela I para informação mais detalhada). Cada espécie foi exposta a uma gama de 8 a 11 concentrações de AZX ou Ortiva<sup>®</sup> (detalhes na Tabela I) e a um controlo negativo (que consistiu no meio de cultura) e outro com solvente (só realizado nos ensaios com AZX; concentração de acetona correspondente à presente nas concentrações mais altas de AZX testada – 12,8 µL de acetona e 9987 µL de meio de cultura para *P. tricornutum*; 6,4 µL de acetona e 9993,6 µL de meio de cultura para *N. gaditana*), durante 72h sob as mesmas condições de temperatura e luminosidade descritas anteriormente para as culturas de laboratório. As concentrações de AZX e Ortiva<sup>®</sup> testadas foram produzidas através da diluição de uma solução correspondente ao dobro da concentração máxima testada, que foi obtida a partir das concentrações stock (200 mg/L) de AZX e das concentrações de trabalho (5g/L para *P. tricornutum* e 1 g/L para *N. gaditana*) de Ortiva<sup>®</sup>. A exposição ocorreu em tubos de vidro onde se adicionou 0,9 mL da solução teste e 0,1 mL de inóculo de microalgas de modo a obter uma concentração inicial de algas por réplica de 10<sup>3</sup> células/mL para *P. tricornutum* e 10<sup>4</sup> células/mL para *N. gaditana*. Após a adição das microalgas, os tubos de ensaio foram cobertos com tiras de Parafilm M<sup>®</sup>, colocados num agitador orbital no interior da incubadora Binder. Além da agitação promovida pelo agitador orbital, todos os dias dos ensaios as microalgas foram agitadas manualmente com um vórtex de modo a evitar o efeito de sombra provocado pela deposição das algas no seu crescimento. Após as 72 h de exposição, a microalga *P. tricornutum* foi fixada com glutaraldeído a 0.25% (49632 FLUKA), de modo a proceder à contagem das células utilizando a metodologia de citometria de fluxo (CyFlow<sup>®</sup> Space, Partec, Alemanha) e o *software* FloMax<sup>®</sup>. No caso de *N. gaditana*, anteriormente ao ensaio verificou-se que esta microalga agrega na

presença de glutaraldeído pelo que a contagem foi realizada com algas não fixadas. O armazenamento das microalgas até se proceder à sua contagem foi efectuado num ultracongelador (Haier DW-86L628, China) a -80 °C. O cálculo da taxa de crescimento específica foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\mu = \frac{\text{Ln}C_{72h} - \text{Ln}C_{0h}}{\Delta t}$$

em que,  $C_{0h}$  e  $C_{72h}$  correspondem à densidade de algas no início e final do ensaio, respetivamente, e  $\Delta t$  ao período de exposição (em dias).

#### **2.2.4. Ensaio de inibição do crescimento com macroalgas**

A macroalga do Género *Ulva* foi selecionada para realizar os ensaios de toxicidade. Indivíduos deste Género foram capturados em zona de intertidal na costa marinha portuguesa em Buarcos (oceano Atlântico, 40°10'16,5''N, 8°53'33,6''W). Em laboratório as macroalgas foram aclimatadas numa incubadora (Binder KBW400, Tuttlingen, Alemanha) durante pelo menos 15 dias, em água artificial marinha suplementada com 1 mM  $\text{KNO}_3$  e 0.1 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , com arejamento contínuo por pedras difusoras ligadas a um filtro de seringa de 0,20  $\mu\text{m}$  (Minisart<sup>®</sup>, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) e em condições de temperatura de 15°C e intensidade luminosa contínua de 1550 lux.

Para realizar os ensaios de toxicidade foram selecionados os indivíduos que durante o período de aclimação apresentaram um crescimento de pelo menos 30%. As condições dos ensaios de toxicidade foram idênticas às condições das culturas e encontram-se descritas em detalhe na Tabela I. A macroalga *Ulva* sp. foi exposta a oito concentrações de AZX, a um controlo negativo (consistiu no meio de cultura) e um

controlo solvente (só no caso de AZX, que correspondeu à concentração máxima de acetona presente na maior concentração de AZX testada: 103 µL de acetona em 39897 µL de meio de cultura) durante 72h. Como não houve crescimento das algas no controlo, não se realizou o ensaio com o Ortiva<sup>®</sup>. Foram seccionados discos com 16 mm de diâmetro de cada indivíduo e colocados, em número de quatro por réplica, em Erlenmeyers de 50 mL com 40 mL de volume de solução teste. Durante o ensaio, as macroalgas foram colocadas num agitador orbital dentro da incubadora e foram também ressuspendidas, tal como no ensaio das microalgas. Terminado o ensaio, retiraram-se os discos dos frascos e fotografaram-se juntos a uma régua (Fig. 1) para determinar as áreas de cada disco a partir do programa IMAGEJ (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>), de maneira a calcular a taxa relativa de crescimento diário (Yong *et al.*, 2013). A taxa relativa de crescimento somático diário foi calculada com base na equação:

$$\mu_{comp} = \left( \frac{LnComp_{72h}}{LnComp_{0h}} \right)^{\frac{1}{\Delta t}} - 1$$

em que,  $Comp_{0h}$  e  $Comp_{72h}$  correspondem ao diâmetro dos médios dos discos de *Ulva* sp. no início e final do ensaio, respectivamente, e  $\Delta t$  ao tempo de exposição.



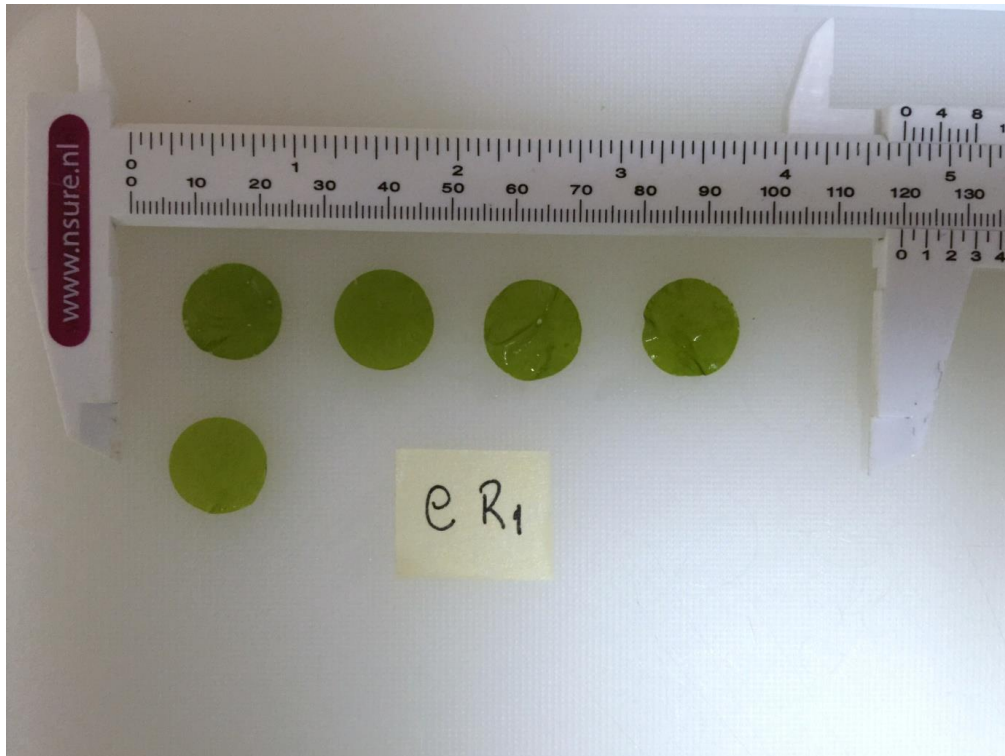


Figura 1 – Medição do diâmetro dos discos da macroalga *Ulva* sp.

### 2.2.5. Ensaio de letalidade com rotíferos

A espécie de rotíferos selecionada para realizar os ensaios de toxicidade letal foi *Brachionus plicatilis*. Estes organismos foram adquiridos sob a forma de ovos de resistência à empresa Microbiotests Inc. (Ghent, Belgium). Aproximadamente 24h antes do início do ensaio, os ovos de resistência foram colocados em meio artificial salino (ASTM E1440, 1991) com temperatura a 25 °C e luminosidade contínua de 1200 lux de modo a promover a eclosão. Imediatamente após eclosão as larvas foram expostas a 10 ou 11 concentrações de AZX (obtidas através da diluição direta da solução stock de 200 mg/L com meio artificial salino) e Ortiva® a um controlo negativo (consistiu em meio artificial salino utilizado durante o procedimento de eclosão) e um controlo solvente (só

no caso de AZX; correspondeu a uma concentração de acetona igual à da concentração máxima testada de AZX – 13,5 µl de acetona em 19986,5 µL de meio artificial salino). Preparou-se 20 mL de meio de exposição, de modo a verificar os parâmetros (salinidade, solubilidade do oxigénio e pH). A exposição decorreu por um período de 24h numa incubadora (FitoClima Bio1200, Aralab, Portugal) com temperatura controlada a 25°C e no escuro (descrição detalhada dos parâmetros de exposição na Tabela I). Após as 24h de exposição foram contabilizados os organismos mortos em cada réplica. Um organismo foi considerado morto quando após um estímulo físico permaneceu imóvel durante 15 segundos.

#### **2.2.6. Ensaio de letalidade com artrópodes**

A espécie de *Artemia franciscana* foi o artrópode escolhido para a realização dos ensaios de toxicidade letal. Os ovos de resistência da *A. franciscana* foram adquiridos à empresa Microbiotests Inc. (Ghent, Belgium). Cerca de 24h antes do início do ensaio, estes ovos de resistência foram eclodidos em meio artificial marinho (Artoxkit M) numa incubadora (FitoClima Bio1200, Aralab, Portugal) a 25 °C e com intensidade luminosa contínua de 1200 lux. Imediatamente após eclosão as larvas foram expostas a 10 ou 11 concentrações de AZX (obtidas através da diluição direta da solução stock de 200 mg/L com meio artificial marinho) e Ortiva<sup>®</sup> a um controlo negativo (consistiu em meio artificial marinho utilizado durante o processo de eclosão) e um controlo solvente (só no caso de AZX; correspondeu a uma concentração de acetona igual à da concentração máxima testada de AZX – 103,2 µl de acetona em 19896,8 µL de meio artificial marinho). Preparou-se 20 mL de meio de exposição de modo a medir os parâmetros. Num período de 24 horas, o ensaio de letalidade das larvas de *A. franciscana* decorreu dentro duma incubadora (FitoClima Bio1200, Aralab, Portugal) com temperatura

controlada a 25°C e no escuro (descrição detalhada dos parâmetros de exposição na Tabela I). No fim do ensaio, contou-se o número de organismos mortos em cada réplica. Foram considerados os organismos mortos, aquele que não apresentaram movimentos durante 15 segundos após um estímulo físico.

### **2.2.7. Ensaio de letalidade com gastrópodes**

Indivíduos da espécie de Gastropoda *Gibbula umbilicalis* foram capturados numa zona de intertidal localizada na costa marinha portuguesa (oceano Atlântico, 40°10'16,5''N, 8°53'33,6''W). Em laboratório os organismos foram mantidos numa incubadora (Binder KBW400, Tuttlingen, Alemanha) em meio artificial marinho, suplementado com 150 mg/L NaHCO<sub>3</sub> (S5761-1KG, Sigma) para manter a rigidez das conchas dos gastrópodes, a uma temperatura de 15°C e fotoperíodo de 16h luz: 8h escuro. Durante o período de aclimação os organismos foram alimentados com a macroalga *Ulva* sp.

Para a realização dos ensaios de toxicidade com *G. umbilicalis* foram seleccionados indivíduos com o comprimento máximo de concha entre os 6,50 e os 8,09 mm, medidos com uma craveira digital electrónica VWR (Radnor, PA, EUA). As condições e o desenho experimental dos gastrópodes estão descritos na norma ASTM E729, 96 (2002) e apresentados na Tabela I. Antes dos ensaios, os caracóis foram colocados num novo meio sem as macroalgas *Ulva* sp. durante 48 horas para estarem todos à mesma situação inicial. O meio de ensaio dos caracóis *G. umbilicalis* foi preparado em frascos de Erlenmeyer a 150 mL. Os juvenis foram expostas a 6 concentrações de AZX e Ortiva<sup>®</sup>, a um controlo negativo (consistiu em meio artificial marinho) e um controlo solvente (só no caso de AZX; correspondeu a uma concentração de acetona igual à da

concentração máxima testada de AZX – 46.87 µl de acetona em 149953.13 µL de meio artificial marinho). Num período de 96 horas, o ensaio de letalidade dos juvenis de *Gibbula umbilicalis* decorreu dentro duma incubadora Binder KBW400, às mesmas condições que a sua aclimatação, só que sem as macroalgas e o suplemento NaHCO<sub>3</sub> (descrição detalhada dos parâmetros de exposição na Tabela I). Os parâmetros (salinidade, solubilidade do oxigénio e pH) foram verificados antes do ensaio. Durante o ensaio foi verificado duas vezes por dia se os caracóis se encontravam submersos no meio do ensaio, caso se encontrassem fora do meio de ensaio eram empurrados ligeiramente com uma pipeta. Além disso, os frascos do ensaio foram tapados com vidro de relógio para evitar a evaporação do meio e a fuga dos caracóis. Após o ensaio, foi verificado o número de mortes dos caracóis. O critério para considerar um organismo morto foi o mesmo utilizado nos ensaios com rotíferos e artémias.

Tabela I – Descrição das condições de exposição e concentrações testadas nos ensaios ecotoxicológicos realizados com as sete espécies marinhas/estuarinas.

Espécies	T (°C)	Condições de luminosidade	Sal.	AZX	Ortiva®	F.D.	Tempo de exposição	Réplicas	Organismos/ réplica	Protocolo
<i>Vibrio fischeri</i>	4	—	—	0,26 – 16,4 mg/L	0,13 – 4,10 g/L	2	5 min	1	—	Basic test; Azur, 1998
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	20	24h L	33	25 – 6400 µg/L	25 – 3200 µg/L	2	72 h	3	10 <sup>4</sup> cél/mL	OECD 201, 2006
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20	24h L	33	50 – 6400 µg/L	256 – 8192 µg/L	2	72 h	3	10 <sup>3</sup> cél/mL	OECD 201, 2006
<i>Ulva</i> sp.	15	24h L	35	30 – 512,6 µg/L	—	1.5	72 h	3	4 discos (16 mm Ø)	Han <i>et al.</i> , 2008; Vonlanthen <i>et al.</i> , 2011
<i>Brachionus plicatilis</i>	25	24h E	20	1250 – 6450 µg/L	1000 – 6200 µg/L	1.2	24 h	6	5	Rotoxkit M (MicroBioTe sts Inc.)
<i>Artemia franciscana</i>	25	24h E	35	150 – 774 µg/L	500 – 3096 µg/L	1.2	24 h	3	10	Artoxkit M (MicroBioTe sts Inc.)
<i>Gibbula umbilicalis</i>	15	16h L: 8h E	34	8,23 – 62,5 µg/L	8,23 – 62,5 µg/L	1.5	96 h	4	5	ASTM E729, 96 (2002)

T: temperatura; L: luz; E: escuridão; Sal.: salinidade; AZX: azoxistrobina; F.D.: factor de diluição

### 2.3. Análise estatística

Com os dados obtidos dos ensaios ecotoxicológicos, construiu-se uma curva de concentração-resposta para cada ensaio, que foi ajustada a um modelo não-linear baseado nos efeitos observados. Para os ensaios em que foi avaliada a mortalidade, calcularam-se as concentrações letais medianas ( $LC_{50}$ ) e os seus respectivos limites de confiança a 95%, utilizando o *software* PriProbit versão 1.63. No caso das respostas de taxa de crescimento populacional, os resultados obtidos foram ajustados com um modelo logístico e as concentrações medianas efetivas calculadas com base no modelo, utilizando *software* STATISTICA™ (StatSoft Inc., 2005; versão 7.0). No caso dos valores de  $EC_{50}$  relativos à inibição de produção de bioluminescência *Vibrio fischeri*, estes foram calculados pelo software Microtox Omni Windows.

Capítulo 3

Resultados

### **3. Resultados**

#### **3.1. Critérios de validade**

Todos os ensaios ecotoxicológicos realizados cumpriram os critérios de validade estabelecidos pelos(as) respetivos(as) protocolos/normas (Azur, 1998; ASTM E729, 2002; OECD 201, 2006), nomeadamente: (i) em todos os ensaios de toxicidade letal a percentagem de mortalidade nos controlos negativos e solventes (com o solvente acetona no caso dos ensaios com o ingrediente ativo AZX) foi inferior a 10%, (ii) nos ensaios de crescimento com as duas espécies de microalgas os coeficientes de variação nos respetivos controlos foi inferior a 10% e a biomassa nos controlos aumentou exponencialmente pelo menos 16 vezes durante o período do ensaio (72h).

#### **3.2. Parâmetros físicos e químicos**

Relativamente aos parâmetros físico-químicos medidos nos meios dos ensaios, não foram registadas alterações relevantes entre as diferentes concentrações testadas (Tabela II para consulta detalhada dos valores mínimos e máximos registados em cada ensaio; todos estes parâmetros foram verificados antes dos ensaios). Os valores de oxigénio dissolvido apresentaram-se sempre acima de 95,5%, indicando que os organismos não estiveram expostos a condições de anóxia ou hipóxia durante os ensaios. Os valores medidos de pH permaneceram num intervalo de neutralidade a ligeiramente básico (6.6 a 8.4); a maior variação (1,5) registada nos valores de pH foi observada no ensaio realizado com *Ulva* sp.



Tabela II – Valores dos parâmetros físico-químicos medidos nas várias concentrações testadas nos ensaios de toxicidade que foram realizados com o ingrediente ativo azoxistrobina e com a formulação comercial Ortiva®.

Espécies	Salinidade	pH	Oxigênio dissolvido	
			mg/L	%
<i>Vibrio fischeri</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Ulva</i> sp.	34,8 – 35,1	6,94 – 8,44	8,84 – 9,87	98,8 – 106
<i>Brachionus plicatilis</i>	14,9	6,57 – 7,34	8,15 – 8,40	97,8 – 101
<i>Artemia franciscana</i>	31,3 – 37,4	6,80 – 7,93	8,51 – 9,33	103 – 106
<i>Gibbula umbilicalis</i>	33,0 – 33,1	7,16 – 8,08	9,05 – 9,18	95,5 – 99,3

ND – Não determinado.

### 3.3. Ensaios ecotoxicológicos

As concentrações de AZX e da sua formulação comercial Ortiva® que provocam 50% de efeito (e respetivos limites de confiança a 95%) nas espécies estudadas encontram-se resumidos na Tabela III.

No ensaio realizado com a macroalga *Ulva* sp. e com a espécie de rotífero *B. plicatilis*, não foram observados efeitos significativos no seu crescimento (nos controlos negativos as macroalgas apenas cresceram em média cerca de 1,55%) ou mortalidade (relativamente ao respectivo controlo), respetivamente, após exposição às várias concentrações de AZX ou Ortiva®. Uma vez que a concentração máxima testada é considerada muito acima das concentrações medidas e esperadas no ambiente [ver Rodrigues *et al.* (2013) para mais informação sobre concentrações de azoxistrobina detetadas no ambiente], foi decidido não realizar ensaios com concentrações acima destes valores. Mais ainda, no ensaio em que a microalga *P. tricornutum* foi exposta a várias concentrações do ingrediente ativo AZX também não foi observada uma inibição

de crescimento relevante (inibição máxima observada foi de 8%), pelo que não foi possível calcular o seu  $EC_{50,72h}$  (sendo este superior à maior concentração testada 6400  $\mu\text{g/L}$ ).

De um modo geral as espécies testadas apresentaram maior sensibilidade ao ingrediente ativo AZX do que à sua formulação comercial Ortiva<sup>®</sup> (Tabela III). No entanto, as duas espécies de microalgas constituíram exceções a este padrão de sensibilidade: *N. gaditana* apresentou uma sensibilidade semelhante aos dois compostos [apresentando sobreposição dos limites de confiança dos  $EC_{50,72h}$ : 298 (202-394) e 323 (189-457), respectivamente para azoxistrobina e Ortiva<sup>®</sup>], enquanto a espécie *P. tricornutum* apresentou uma maior sensibilidade à formulação comercial Ortiva<sup>®</sup> [ $EC_{50,72h} = 2750$  (2479-3020), enquanto o  $EC_{50,72h}$  para AZX é superior a 6400  $\mu\text{g/L}$ ].

A bactéria *V. fischeri* foi a espécie que apresentou maior tolerância aos dois compostos, apresentando valores de  $EC_{50,5min, \text{ produção de bioluminescência}}$  de 10,3 (8,68-12,1)  $\text{mg/L}$  e 1,23 (0,94-1,60)  $\text{g/L}$  para AZX e Ortiva<sup>®</sup>, respectivamente. A espécie de Gastropoda *G. umbilicalis* foi a mais sensível aos dois compostos testados, tendo apresentado os seguintes valores de  $LC_{50,96h, \text{ mortalidade}}$ : 13,2 (10,4-15,9)  $\mu\text{g/L}$  para AZX e 17,0 (12,7 – 22,0)  $\mu\text{g/L}$  para Ortiva<sup>®</sup>.

Tabela III – Valores das concentrações (e respectivos limites de confiança a 95%) do ingrediente ativo azoxistrobina (AZX) e da sua formulação comercial Ortiva<sup>®</sup> que provocam 50% de efeito (EC<sub>50</sub> ou LC<sub>50</sub>) nas espécies estudadas.

Espécie	Parâmetro ecotoxicológico	Concentração (limite de confiança a 95%)	
		AZX	Ortiva <sup>®</sup>
<i>Vibrio fischeri</i>	EC <sub>50,5min</sub> , produção de bioluminescência	10,3 mg/L (8,68-12,1)	1,23 g/L (0,94-1,60)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	EC <sub>50,72h</sub> , taxa de crescimento populacional	298 µg/L (202-394)	323 µg/L (189-457)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EC <sub>50,72h</sub> , taxa de crescimento populacional	> 6400 µg/L	2750 µg/L (2479-3020)
<i>Ulva</i> sp.	EC <sub>50,72h</sub> , taxa de crescimento somático	—	—
<i>Brachionus plicatilis</i>	LC <sub>50,24h</sub> , mortalidade	> 6400 µg/L	> 6200 µg/L
<i>Artemia franciscana</i>	LC <sub>50,24h</sub> , mortalidade	460 µg/L (423-503)	1252 µg/L (1087-1454)
<i>Gibbula umbilicalis</i>	LC <sub>50,96h</sub> , mortalidade	13,2 µg/L (10,4-15,9)	17,0 µg/L (12,7-22,0)

### 3.4. Cálculo do risco

O quociente de risco foi calculado apenas para o ingrediente ativo AZX uma vez que não foram encontrados na bibliografia científica valores de concentrações da formulação comercial no ambiente aquático o que impossibilitou o cálculo do quociente de risco para este composto.

Para calcular o risco ecológico do ingrediente ativo AZX foi aplicado o procedimento que utiliza um factor de ponderação para calcular a concentração prevista que não provoca efeitos (PNEC). Esta é uma metodologia determinística que calcula o PNEC com base em parâmetros de toxicidade obtidos através de ensaios ecotoxicológicos monoespecíficos (Scheringer *et al.*, 2002; EC, 2003). Dependendo da quantidade de parâmetros ecotoxicológicos disponíveis é aplicado um factor de ponderação que varia entre 10 e 1000. No caso do trabalho presente, como foram monitorizadas maioritariamente respostas de mortalidade ou respostas que podem estar associadas à ocorrência de mortalidade (diminuição de densidade/produção de bioluminescência no final dos ensaios com as espécies de microalgas e com a bactéria) foi aplicado o factor de ponderação 1000 ao valor mais baixo de  $LC_{50}/EC_{50}$  que foi calculado (correspondeu ao valor de  $EC_{50}$  calculado para a espécie *G. umbilicalis*). Deste modo, o valor de PNEC calculado para AZX foi de 0,0132 µg/L.

O valor de concentração prevista no ambiente (PEC) para AZX foi determinado com base no valor mais alto medido em rios e identificado na bibliografia científica publicada. Deste modo, o valor de PEC utilizado para calcular o quociente de risco foi 30 µg/L (concentração máxima medida em rios dos França no verão; Rodrigues *et al.*, 2013). Com base no valor de PNEC e PEC foi calculado o quociente de risco (PEC/PNEC) de AZX que correspondeu a um valor de 2273. Este valor indica um risco considerado muito elevado.

Capítulo 4

Discussão

#### 4. Discussão

A nível mundial o uso de pesticidas no sector agrícola é considerado fundamental para se manterem níveis de produção satisfatórios. No entanto, em paralelo existe um debate intenso sobre se os benefícios resultantes do uso destes compostos químicos compensam os riscos ambientais que advêm do seu uso. Neste sentido, as agências internacionais de regulamentação veicularam leis que obrigam a uma caracterização física, química e ecotoxicológica detalhada dos pesticidas para se proceder à aprovação da sua comercialização e, deste modo, promover o uso sustentável destes compostos e uma maior proteção ambiental. De um modo geral esta caracterização é feita ao ingrediente ativo, no entanto, as formulações comerciais, comumente, são compostas por outros ingredientes inertes que podem alterar a toxicidade do ingrediente ativo (aumentando ou diminuindo a sua toxicidade; e.g. Lipok *et al.*, 2010; Puglis & Boone, 2011), sendo portanto necessário também proceder à caracterização destes últimos compostos. Deste modo, o presente trabalho pretendeu avaliar e comparar os efeitos adversos provocados pelo ingrediente ativo AZX e pela sua formulação comercial Ortiva<sup>®</sup> em espécies não-alvo marinhas/estuarinas. Foram colocadas as seguintes hipóteses: (i) as espécies não-alvo apresentam uma gama de sensibilidades alargada à AZX e ao Ortiva<sup>®</sup> e (ii) os dois compostos químicos apresentam diferentes níveis de toxicidade para as espécies não-alvo testadas.

Os resultados obtidos permitem confirmar a primeira hipótese uma vez que os valores de LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> diferiram em pelos menos duas ordens de magnitude entre as espécies testadas quer para AZX quer para Ortiva<sup>®</sup>. Estes resultados eram esperados uma vez que no artigo de revisão publicado por Rodrigues *et al.* (2013) a compilação de valores de LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> para cinco espécies marinhas/estuarinas incluem um intervalo de valores com pelo menos uma ordem de magnitude (valor mais baixo de LC<sub>50,96h</sub> para

juvenis de *Americamysis bahia* - 56 µg/L e valor mais alto de LC<sub>50,48h</sub> para *Crassostrea gigas* - 1300 µg/L). Mais ainda, a variabilidade na sensibilidade de espécies a vários tipos de substâncias químicas é bem conhecida e fundamentada na bibliografia científica (e.g. DeLorenzo *et al.*, 2001). Esta diferença interespecífica na sensibilidade a compostos químicos pode estar relacionada com vários fatores intrínsecos à espécie como, por exemplo, diferentes vias de entrada e internalização dos contaminantes nos organismos, distintos níveis basais de atividade de enzimas envolvidas em mecanismos de detoxificação, expressão diferencial de genes envolvidos em mecanismos de detoxificação, tamanhos corporais diferentes, entre muitos outros factores (ex. Brown *et al.*, 2004; Muysen *et al.*, 2005). No presente trabalho (e comparando também com os dados de toxicidade já publicados para organismos marinhos/estuarinos expostos a AZX; consultar a revisão dos valores publicados em Rodrigues *et al.*, 2013) a espécie de gastrópode *G. umbilicalis*, apesar de possuir uma concha que poderia servir de alguma proteção à exposição aos compostos químicos, foi a que apresentou maior sensibilidade quer a AZX quer a Ortiva<sup>®</sup> (LC<sub>50,96h</sub> 13,2 e 17,0 µg/L, respetivamente). Para além da influência dos fatores descritos acima, este resultado pode estar relacionado com o facto de esta espécie apresentar um órgão especializado na metabolização de xenobióticos, o fígado, que pode resultar na produção de subprodutos mais tóxicos para o organismo do que a AZX. Por exemplo, Guilhermino *et al.* (1996) verificou que o insecticida paratião provoca uma maior inibição na atividade da enzima acetilcolinesterase (do organismo *Daphnia magna*) em exposições *in vivo* comparativamente com exposições *in vitro*. Os autores sugerem precisamente que estes resultados estão relacionados com o facto de na exposição *in vitro* não ser considerada a via de metabolização dos compostos no interior do organismo, que pode originar subcompostos que podem apresentar maior (ou menor) toxicidade para o indivíduo. No

caso do trabalho de Guilhermino *et al.* (1996) durante a exposição *in vivo* a metabolização do paratião originou o subproduto paraoxão que apresenta uma toxicidade mais elevada que o composto que lhe deu origem.

Relativamente à segunda hipótese que foi colocada, observaram-se diferenças na toxicidade dos dois compostos para as espécies testadas. De um modo geral o ingrediente ativo apresentou maior toxicidade do que a formulação comercial Ortiva<sup>®</sup>. Interessantemente as microalgas foram as únicas espécies em que a AZX não apresentou maior toxicidade do que o Ortiva<sup>®</sup>. Este resultado pode estar relacionado com o facto de as microalgas possuírem parede celular, que pode dificultar de forma diferenciada a internalização destes compostos relativamente aos outros organismos testados.

Na literatura científica existem já alguns trabalhos publicados em que é comparada a toxicidade do ingrediente ativo e das suas formulações comerciais. No entanto, não é possível identificar um padrão de maior toxicidade associada ao ingrediente ativo ou às suas formulações comerciais, dependendo do composto químico e da espécie testada. Como alguns exemplos: (i) Hourmant *et al.* (2009) comparou a toxicidade da substância activa bentazona (herbicida) com a sua formulação comercial Basamais<sup>®</sup> no crescimento da microalga *Chaetoceros gracilis*; a formulação comercial ( $EC_{50,72h} = 60 \mu\text{g/L}$ ) demonstrou ser mais tóxica que a substância activa bentazona ( $EC_{50,72h} = 150 \text{mg/L}$ ); (ii) Amara *et al.* (2013) determinou a toxicidade do fungicida epoxiconazol e da sua formulação comercial Opus<sup>®</sup> num ensaio de toxicidade com a diatomácea marinha *Chaetoceros calcitrans*, e também observou uma maior toxicidade da formulação Opus<sup>®</sup> ( $2.9 \pm 0.24 \mu\text{g/L}$ ) comparativamente a epoxiconazol ( $2310 \pm 180 \mu\text{g/L}$ ); (iii) Plugis e Boone (2011) compararam a toxicidade de sete ingredientes ativos com as suas correspondentes formulações comerciais para a espécie de rã *Rana clamitans* e



verificaram que as formulações comerciais revelaram ser mais tóxicas do que os seus ingredientes ativos em três dos sete pesticidas estudados; (iv) contrariamente aos exemplos anteriores, Beggel *et al.* (2010), observaram que as formulações comerciais dos insecticidas Talstar<sup>®</sup> and Termidor<sup>®</sup> apresentam maior toxicidade para larvas de *Pimephales promelas* do que os correspondentes ingredientes ativos e (v) Pereira *et al.* (2009) verificaram que a formulação comercial do herbicida Stam é mais tóxico que o ingrediente ativo (propanil) para a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

As diferenças observadas entre a toxicidade das formulações comerciais e os seus ingredientes ativos pode ser atribuída em parte à adição de ingredientes inertes, estes podem promover um aumento ou a diminuição da toxicidade do ingrediente ativo através de efeitos antagonistas, aditivos ou sinérgicos entre os compostos (tal como ilustrado pelos exemplos mencionados acima). No entanto, salvo poucas exceções (ex. adição do surfactante POEA na formulação comercial do glifosato; Howe *et al.*, 2004) estes ingredientes são desconhecidos uma vez que as indústrias produtoras de pesticidas não são obrigadas a fornecer esta informação, o que dificulta o estudo e compreensão dos fatores que determinam a toxicidade das formulações comerciais (Malev *et al.*, 2012).

Em termos de análise de risco de pesticidas, que de um modo geral é feita com base no ingrediente ativo, o cenário em que a formulação comercial apresenta maior toxicidade que o seu ingrediente ativo é o mais preocupante pois o risco será subestimado e os ecossistemas receptores do pesticidas irão estar subprotegidos. No trabalho presente, de um modo geral a AZX demonstrou ser mais tóxica que a sua formulação comercial sugerindo que uma avaliação de risco do ingrediente ativo não irá subestimar o risco ecológico em ecossistemas marinhos/estuarinos.

Apesar de não constituir um objectivo principal deste trabalho, foi calculado o quociente de risco para a AZX, que revelou ser muito elevado. Este constituiu um resultado esperado pois a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) num relatório que publicou relativo à avaliação de risco de azoxistrobina (EFSA, 2010) concluiu que este pesticida é considerado muito tóxico para organismos aquáticos. Mais ainda, considerando a classificação da Comissão da União Europeia de acordo com a norma 93/67/EEC-Annex 1 (1996) a azoxistrobina e a sua formulação química deverão ser colocadas na categoria de *Extremamente Tóxico* uma vez que apresentam valores de  $EC_{50}$  inferiores a 0,1mg/L. No entanto, deve ser realçado relativamente ao valor do quociente de risco calculado neste trabalho para AZX que este cálculo foi feito com base num valor de PEC para regiões não estuarinas de um rio. Apesar de ser expectável que os valores de AZX em zonas estuarinas não sejam mais baixos, pois estas regiões constituem áreas de deposição e acumulação de contaminantes com origem a montante, as interpretações a derivar deste valor devem ser prudentes.

Capítulo 5

Conclusão

## 5. Conclusão

A avaliação de riscos dos pesticidas continua a ser um dos grandes desafios no que respeita aos problemas provocados pela agricultura e produção intensiva. Os organismos estuarinos podem sofrer vários efeitos adversos devido a contaminação ambiental por pesticidas, pois para além de estarem expostos a concentrações de pesticidas oriundas de regiões a montante e que são transportados na coluna de água, do rio, entrando desta forma nos estuários, estão também expostos a pesticidas que se acumulam nos sedimentos estuarinos que são continuamente ressuspensos devido à ação das marés ou dragagens. No entanto, tal como foi referido neste trabalho existem poucos trabalhos de avaliação de risco de pesticidas em organismo marinhos/estuarinos e esta falha de conhecimento ainda é mais evidenciada no que respeita à comparação da toxicidade dos ingredientes ativos e das suas formulações comerciais. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam a necessidade de gerar informação sobre a toxicidade de pesticidas para uma gama de espécies pertencentes a diferentes grupos taxonómicos e funcionais, pois existe uma grande variabilidade na sensibilidade a estes compostos e uma espécie mais sensível a um determinado pesticida pode não o ser a um pesticida pertencente a outro grupo químico. Mais ainda, é fundamental compreender de que modo os ingredientes inertes que são adicionados aos pesticidas interagem com as substâncias ativas e de que modo podem influenciar/alterar a sua toxicidade. Este conhecimento é fundamental para gerar análises de risco ecológico de pesticidas exatas, evitando sub- ou sobre-estimar o risco real que é fundamental para a proteção dos ecossistemas, mas também para um desenvolvimento sustentável do setor agrícola.

No caso específico da AZX e da sua formulação comercial Ortiva<sup>®</sup>, o presente estudo revelou que ambas são altamente tóxicas para o biota marinho/estuarino. No geral, a substância ativa apresentou-se mais tóxica que a sua formulação comercial.

Contudo sugere-se que sejam desenvolvidos trabalhos futuros no sentido de averiguar os modos de ação desta formulação no biota aquático envolvendo o estudo da influência de factores abióticos e bióticos na sua toxicidade.

## Referências bibliográficas

## Referências bibliográficas

- ABOFHBM, Associação de Beneficiários da Obra de Fomento Hidroagrícola do Baixo Mondego. Relatório e Contas 2012. (<http://www.abofhbm.net/Relatorio2012.pdf>) [acedido em 24 de julho de 2014].
- Aktar, M.W., Sengupta, D., Chowdhury, A. (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2(1): 1–12.
- Amara, A., Quiniou, F., Durand, G., Bour, M.E., Boudabous, A., Hourmant, A. (2013) Toxicity of epoxiconazole to the marine diatom *Chaetoceros calcitrans*: influence of growth conditions and algal development stage. *Water, Air & Soil Pollution* 224: 1-9.
- ARTOXXIT M™ Artemia toxicity screening test for estuarine and marine waters. Standard Operational Procedure. Kleimoer, Gent, Belgium. 28 pp. ([www.microbiotests.be](http://www.microbiotests.be)).
- ASTM E729-96(2014), Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians, ASTM International, West Conshohocken, PA. 22pp ([www.astm.org](http://www.astm.org)).
- AZUR Environmental, Microtox® Omni Manual, Azur Environmental, Carlsbad, CA, USA, 1998.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godfrey, C.R.A., Godwin, J.R., Hall, A.A., Heaney, S.P., Maund, S.J. (2001) Understanding the strobilurin fungicides. *The Royal Society of Chemistry, Pesticide Outlook* 12(4): 143–148.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B. (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58: 649–662.

- Battaglin, W.A., Sandstrom, M.W., Kuivila, K.M., Kolpin, D.M., Meyer, M.T. (2011) Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other fungicides in US streams, 2005–2006. *Water Air Soil Pollut.* 218: 307–322.
- Beggel, S., Werner, I., Connon, R.E., Geist, J.P. (2010) Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Science of the Total Environment* 408(16): 3169–3175.
- Berenzen, N., Lentzen-Godding, A., Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., Liess, M. (2005) A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere* 58: 683–691.
- Brown R.J., Galloway T.S., Lowe D., Browne M.A., Dissanayake A., Jones M.B., Depledge M.H. 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology* 66: 267-278.
- Bocquené, G., Franco, A. (2005) Pesticide contamination of the coastline of Martinique. *Marine Pollution Bulletin* 51(5-7): 612-619.
- Carmichael, N.G. (2005) Toxicity of agrochemical formulations. *Scand. J. Work Environ. Health* 31(1): 146-150.
- Caux, P.Y., Ménard, L., Kent, R.A. (1996) Comparative study of the effects of MCPA, butylate, atrazine, and cyanazine on *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Pollution* 92: 219-225.
- Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M.J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A.M. (2003) Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research* 37(5): 1055-1063.



- Cox, C., Surgan, M. (2006) Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: Implications for Human and Environmental Health. *Environmental Health Perspectives* 114(12): 1803-1806.
- De A., Bose R., Kumar, A. Mozumdar S. (2014) Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *SpringerBriefs in Molecular Science*. 99 pp.
- DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E. (2001) Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(1): 84–98.
- DeLorenzo, M.E., Fulton, M.H. (2012) Comparative risk assessment of permethrin, chlorothalonil, and diuron to coastal aquatic species. *Marine Pollution Bulletin* 64(7): 1291–1299.
- Donald, D.B., Cessna, A.J., Sverko, E., Glozier, N.E. (2007) Pesticides in Surface Drinking-Water Supplies of the Northern Great Plains. *Environmental Health Perspectives* 115(8): 1183-1191.
- DRAPC. Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro. 2009 (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>) [acedido em 24 de julho de 2014].
- Dunn, A.K. (2012) Chapter two – *Vibrio fischeri* Metabolism: Symbiosis and Beyond. *Advances in Microbial Physiology* 61: 37-68.
- EEA Technical report (2011) Hazardous substances in Europe's fresh and marine waters: An overview. European Environment Agency 8: pp61.
- EFSA. 2010. Peer review report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance azoxystrobin. *EFSA J.* 8(4): 1542. 110 pp. Parma, Italy.

(<http://www.efsa.europa.eu/en/publications/efsajournal.htm>) [acedido em 28 de julho de 2015].

European Commission. Final report on the ecological risk assessment of chemicals.

Adopted by the scientific steering committee at its meeting of 6–7 March, 2003, 11pp.

Filho, A.M., dos Santos, F.N., de Pereira, P.A.P. (2010) Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC–MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. *Microchem. J.* 96: 139–45.

Garanzini, D.S., Menone, M.L. (2015) Azoxystrobin Causes Oxidative Stress and DNA Damage in the Aquatic Macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94(2): 146–151.

Ghosh, R.K., Singh, N. (2009) Effect of organic manure on sorption and degradation of azoxystrobin in soil. *J. Agric. Food Chem.* 57: 632–636.

Gilliom, R.J. (2007) Pesticides in U.S. Streams and Groundwater. *Environmental Science & Technology* 41(10): 3408-3414.

Guilhermino L., Lopes M.C., Carvalho A.P., Soares A.M.V.M. (1996) Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* 32:727-738.

Han, T., Kang, S.H., Park, J.S. Lee, H.K., Brown, M.T. (2008) Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. *Aquatic Toxicology* 86(2): 176–184.

Hourmant, A., Amara, A., Pouline, P., Durand, G., Arzul, G., Quiniou, F. (2009) Effect of bentazon on growth and physiological responses of marine diatom: *Chaetoceros gracilis*. *Toxicology, Mechanisms and Methods* 19: 109-115.

- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K., Veldhoen, N. (2004) Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 1928–1938.
- IUPAC. Pesticide Properties Database (2012) developed by the Agriculture & Environment Research Unit (AERU), University of Hertfordshire, funded by UK national sources and the EU-funded FOOTPRINT project (FP6-SSP-022704). (<http://www.eu-footprint.org/ppdb.html>) [acedido em 13 de junho de 2015].
- Jørgensen, L.F., Kjær, J., Olsen, P., Rosenbom, A.E. (2012) Leaching of azoxystrobin and its degradation product R234886 from Danish agricultural field sites. *Chemosphere* 88: 554–562.
- Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., Morin, A.E., Gobas, F.A.P.C. (2007) Food Web-Specific Biomagnification of Persistent Organic Pollutants. *Science* 317: 236-239.
- Kim, H.Y., Chung, J.M., Chung, K. (2008) Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice: the effect of mitochondrial electron transport complex inhibitors. *Neurosci. Lett.* 447: 87–91.
- Kim, J.H., Campbell, B.C., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R.J., May, G.S. (2007) Enhanced activity of strobilurin and fludioxonil by using berberine and phenolic compounds to target fungal antioxidative stress response. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 134–141.
- Kumar, A., Bohra, C., Singh, S. (2005) Hazards of Pesticides on Aquatic Ecosystems of Jharkhand: A Critical Review. APH Publishing Corporation, New Delhi, India. pp1-6.

- Liess, M., von der Ohe, P.C. (2005) Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(4): 954–65.
- Lipok, J., Studnik, H., Gruyaert, S. (2010) The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1681-1688.
- Liu, L., Jiang, C., Wu, Z.Q., Gong, Y.X., Wang, G.X. (2013) Toxic effects of three strobilurins (trifloxystrobin, azoxystrobin and kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98: 297–302.
- Malev, O., Klobučar, R.S., Fabbretti, E., Trebše, P. (2012) Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104(3): 178–186.
- Mohammed, A. (2013). Why are Early Life Stages of Aquatic Organisms more Sensitive to Toxicants than Adults?, *New Insights into Toxicity and Drug Testing*, Dr. Sivakumar Gowder (Ed.), ISBN: 978-953-51-0946-4, InTech, DOI: 10.5772/55187. Disponível em: (<http://www.intechopen.com/books/new-insights-into-toxicity-and-drug-testing/why-are-early-life-stages-of-aquatic-organisms-more-sensitive-to-toxicants-than-adults->)
- Muysen, B.T.A., Bossuyt, B.T.A., Janssen, C.R. (2005) Inter- and intra-species variation in acute zinc tolerance of field-collected cladoceran populations. *Chemosphere* 61: 1159-1167.

- OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development) (2006) Freshwater alga and cyanobacteria growth inhibition test. OECD guideline for testing of chemicals 201, Paris, France, pp 25.
- Pereira, J.L., Antunes, S.C., Castro, B.B., Marques, C.R., Gonçalves, A.M.M., Gonçalves, F., Pereira, R. (2009) Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18: 455-463.
- Puglis, H.J., Boone, M.D. (2011) Effects of Technical-Grade Active Ingredient vs. Commercial Formulation of Seven Pesticides in the Presence or Absence of UV Radiation on Survival of Green Frog Tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60: 145-155.
- REA, Relatório do Estado do Ambiente 2014 developed by the Departamento de Estratégias e Análise Económica. Agência Portuguesa do Ambiente. (<http://sniamb.apambiente.pt/infos/geoportaldocs/REA/rea2014.pdf>) [acedido em 18 de janeiro de 2015].
- Rodrigues, E.T., Lopes, I., Pardal, M.A., (2013) Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A review. *Environment International* 53: 18–28.
- Rotokit M™24h-48h Rotifer toxicity screening test for estuarine and marine waters. Standard Operational Procedure. Kleimoer, Gent, Belgium. 28 pp. ([www.microbiotests.be](http://www.microbiotests.be)).
- Scheringer, M., Steinbach, D., Escher, B., Hungerbuhler, K. (2002) Probabilistic approaches in the effect assessment of toxic chemicals what are the benefits and limitations? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9: 307–314.

- Smith, R., Middlebrook, R., Turner, R., Huggins, R., Vardy, S., Warne, M. (2012) Large-scale pesticide monitoring across Great Barrier Reef catchments – Paddock to Reef Integrated Monitoring, Modelling and Reporting Program. *Marine Pollution Bulletin* 65: 117-127.
- Stanley Alliance Info-Tech, 2011. The Story of the Strobilurin Fungicide. Online. AgroNews, (<http://news.agropages.com/WiKi/Detail—4388.htm>).
- Stenrød, M., Heggen, H.E., Bolli, R.I., Eklo, O.M. (2008) Testing and comparison of three pesticide risk indicator models under Norwegian conditions: a case study in the Skuterud and Heiabekken catchments. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123: 15–29.
- US-EPA, United States Environmental Protection Agency, 1997. Azoxystrobin pesticide fact sheet. (<http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/azoxystrobin.pdf>) [acedido em 18 de junho de 2015].
- Vonlanthen, V., Brown, M.T., Turner, A. (2001) Toxicity of the amphoteric surfactant, cocamidopropyl betaine, to the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology* 20(1): 202–207.
- Yong, Y.S., Yong, W.T.L., Anton, A. (2013) Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. *Journal of Applied Phycology* 25(6): 1831–1834.
- Zhang, Y.J., Zhang, X., Chen, C.J., Zhou, M.G., Wang, H.C. (2010) Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98(2): 151-157
- Zhu, B., Liu, T.Q., Hu, X.G., Wang, G.X. (2013) Developmental toxicity of 3, 4-dichloroaniline on rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos and larvae. *Chemosphere* 90: 1132–1139.