

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Efeitos ecotoxicológicos de pesticidas e factores
abióticos em *Daphnia magna***

Maria de Fátima Saavedra Barroso

Dissertação em Contaminação e Toxicologia Ambientais

Julho / 2009

Maria de Fátima Saavedra Barroso

Efeitos ecotoxicológicos de pesticidas e factores abióticos em *Daphnia magna*

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Contaminação e Toxicologia Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professora Doutora Lúcia Guilhermino

Instituição – Professora Catedrática do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Co-orientador – Doutora Laura Guimarães

Instituição – Investigadora Auxiliar do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

“Não herdámos a Terra dos nossos pais,
pedimo-la emprestada aos nossos filhos. ”

Antoine de Saint Exupéry

Dedico este trabalho aos meus pais
(José e Dores), e ao meu marido (Daniel).

Obrigada por todo o apoio e
por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

A todas as *Daphnias* que me acompanharam durante este ano, e com as quais passei muito tempo da minha vida, e que se portaram muito bem, o meu muito obrigado pelo seu sacrifício no verdadeiro sentido da palavra.

Ao concluir este trabalho, é com profundo reconhecimento que agradeço, á Professora Doutora Lúcia Guilhermino, orientadora científica desta dissertação, por todo o apoio e orientação e por sempre me motivar, sem me ter deixado desistir, estou-lhe profundamente grata.

De igual modo, estou extremamente agradecida á Doutora Laura Guimarães por todo o apoio, ajuda, amizade, orientação em todas as fases do trabalho. Pela leitura criteriosa dos textos e pela inestimável disponibilidade.

Agradeço a Alexandra Martins, colega do Laboratório de Ecotoxicologia por toda a ajuda, disponibilidade e amizade.

Agradeço também a todas as colegas deste mestrado, pela amizade e companheirismo nestes dois anos difíceis.

RESUMO

Nas últimas décadas a contaminação de origem antropogénica dos ecossistemas aquáticos tem vindo sucessivamente a aumentar. Em consequência, resíduos de pesticidas como a simazina, usada no controlo de plantas infestantes, e a deltametrina, empregue no controlo de pragas de artrópodes de vários tipos de culturas e plantas ornamentais, são frequentemente detectados em águas naturais. A poluição antropogénica tem também contribuído intensamente para a alteração de factores abióticos da água, como a temperatura e a concentração de nitritos, que podem interferir com processos fisiológicos e metabólicos vitais para os organismos aquáticos. O aumento da temperatura da água é um dos mais importantes por influenciar tanto processos fisiológicos essenciais como a toxicidade de várias substâncias químicas, levantando por isso questões relacionadas com o seu efeito na toxicidade de pesticidas. A concentração de nitritos na água é um factor que tem vindo a reunir cada vez mais interesse, quer por estar a sofrer um aumento em ecossistema poluídos quer pela toxicidade que este aumento pode provocar nos organismos aquáticos, criando a necessidade de avaliação do seu efeito combinado com outros xenobióticos comuns nestes ecossistemas. *Daphnia magna* é um organismo teste muito utilizado em ecotoxicologia na avaliação da toxicidade de substâncias químicas, tendo sido a espécie escolhida para a realização deste estudo. Assim, os objectivos específicos deste trabalho consistiram em estudar o efeito de um aumento de temperatura na toxicidade aguda da simazina para *D. magna* avaliar e prever os efeitos de uma mistura de deltametrina e nitritos na sobrevivência deste cladóceros típico de ecossistemas dulciaquícolas. Para o efeito realizaram-se testes padronizados de toxicidade aguda com simazina, às temperaturas de 20 e 25 °C, e um ensaio de mistura binária em que foram testados em simultâneo as substâncias simples e vinte combinações diferentes de deltametrina e nitritos. Os resultados obtidos sugerem que o aumento de temperatura induz um aumento da toxicidade aguda da simazina, com valores de CL50 às 48 horas que diminuíram de 24.9 mg/L, IC95%=(13.5-164.4) à temperatura de 20 °C, para 12.3 mg/L, IC95%=(8.9-22.2) à temperatura de 25 °C.

Nos animais a deltametrina interfere com o fecho dos canais de sódio de células neuronais, enquanto que os nitritos actuam sobretudo pela oxidação dos pigmentos transportadores de oxigénio tornando-os incapazes de participar neste processo fundamental, o que indica modos de acção diferentes para estas

substâncias. Assim, para o estudo da toxicidade desta mistura utilizou-se o modelo de acção independente (AI), como referência, ao qual foram adicionadas funções de desvio que permitem estudar desvios de sinergismo/antagonismo e desvios dependentes do nível de concentração ou da razão entre componentes da mistura (*MixTox Models*). A análise dos resultados obtidos sugere um efeito dependente da razão entre componentes da mistura na sobrevivência de *D. magna*. Prevê-se para esta mistura efeitos toxicológicos mais acentuados quando a deltametrina é dominante, e uma diminuição da toxicidade quando os nitritos são o componente principal. Para além disso, tal como já foi verificado para outras misturas binárias em que um pesticida foi utilizado como um dos componentes, o modelo AI não foi também neste caso o que melhor permitiu descrever os resultados obtidos e prever a toxicidade da mistura. Neste sentido, os *MixTox Models* constituíram uma ferramenta muito útil para o estudo de desvios ao modelo AI e, conseqüentemente, para a avaliação e previsão dos efeitos desta mistura binária em *D. magna*.

Palavras-chave: *Daphnia magna*, pesticidas, toxicidade aguda, factores abióticos, toxicidade de misturas.

ABSTRACT

In the last decades anthropogenic contamination of aquatic ecosystems has been increasing continuously. Consequently, residues of pesticides such as simazine, used in the control of weeds, and deltamethrin, used in the control of arthropod pests of various types of crops and ornamental plants, are commonly found in natural waters. In addition, the anthropogenic pollution is also contributing heavily to change water abiotic factors, such as temperature and the concentration of nitrite, which can interfere with both physiological and metabolic processes vital to aquatic organisms. The increase in water temperature is one of the most important factors for its influence in essential physiological processes and in the toxicity of various chemicals, as well, raising interest on the study of its effect on the toxicity of pesticides. The concentration of nitrite in water has been gathering increasing attention, not only because of its increase in several polluted ecosystems but also because of the toxicity to aquatic organisms that might arise from this increase. This situation creates, thus, the need to assess the combined effects of nitrites with other xenobiotics common in polluted ecosystems. *Daphnia magna*, the test species chosen for this study, is a standard organism in ecotoxicology widely used for the evaluation of the toxicity of chemical compounds. The specific objectives of this work consisted, therefore, in studying the effect of increased temperature on the toxicity of simazine to *D. magna* and to evaluate and predict the effects of a mixture of deltamethrin and nitrite on the survival of this freshwater cladoceran. To this end, the following ecotoxicological bioassays were carried out: standardised acute toxicity tests with simazine, at the temperatures of 20 and 25 ° C, and an exposure to a binary mixture in which both single substances and twenty different combinations of deltamethrin and nitrite were tested. The results suggest that the temperature increase may induce an increase in the acute toxicity of simazine to *D. magna*. Forty-eight hour LC50 values decreased from 24.9 mg / L, 95%CI=(13.5-164.4) at 20 ° C to 12.3 mg / L, 95%CI=(8.9-22.2) at a temperature of 25 ° C.

In animals, deltamethrin interferes with the closing of sodium channels in neuronal cells, while nitrites act primarily by oxidation of the oxygen transporting pigments making them unable to participate in this crucial process. This information indicates different modes of action for these substances. Thus, the reference model of independent action (IA) was chosen to study the toxicity of

this mixture. In order to allow for the study of possible interactions between these two substances, three deviation functions were added to this model, which allowed for the analysis of synergism/antagonism deviations, as well as, of dose level- and dose ratio-dependent deviations (MixTox Models). The results suggest a dose ratio-dependent effect of this binary mixture on the survival of *D. magna*. According to this, the toxicity of the mixture will be more pronounced when deltamethrin is dominant, and a decrease in toxicity should be expected when nitrite is the main component. Also in this case, as already observed for other binary mixtures in which a pesticide was used as a component, the IA model was not able to provide the best description of the data and prediction of the toxicity of the mixture. In this sense, the MixTox Models have been a very useful tool for assessing and predicting the effects of this binary mixture to *D. magna*.

Key-Words: *Daphnia magna*, pesticides, acute toxicity, water abiotic factors, mixture toxicity.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS	1
I.1. Introdução geral	1
I.2. Objectivos	8
CAPÍTULO II. EFEITO DA TEMPERATURA NA TOXICIDADE AGUDA DA SIMAZINA PARA D. MAGNA	9
II.1. Introdução	9
II.2. Material e métodos	15
II.2.1. Cultura de <i>Daphnia magna</i>	15
II.2.1.1. Meio de cultura	16
II.2.1.2. Suplemento orgânico de <i>A. nodosum</i>	16
II.2.1.3. Alimento	16
II.2.1.3.1. Cultura de <i>C. vulgaris</i>	17
II.2.1.3.2. Preparação do alimento	17
II.2.2. Ensaio padronizados de toxicidade aguda	18
II.2.3. Soluções teste	19
II.2.4. Análise estatística	20
II.3. Resultados	20
II.4. Discussão	23
CAPÍTULO III. TOXICIDADE AGUDA DE UMA MISTURA BINÁRIA DE DELTAMETRINA E NITRITOS PARA D. MAGNA	25
II.1. Introdução	25
II.2. Material e métodos	29
II.2.1. Organismos teste	29
II.2.2. Plano experimental	29
II.2.3. Ensaio de toxicidade	30
II.2.4. Soluções teste	31
II.2.5. Análise estatística	31
II.3. Resultados	33
II.4. Discussão	38
CAPÍTULO IV. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	41
CAPÍTULO V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural da Simazina.

Figura 2 – Curvas de toxicidade aguda da simazina para *Daphnia magna*, às 24 e às 48 h, obtidas nos ensaios realizados a 20 °C (A) e a 25 °C (B).

Figura 3- Fórmula estrutural da Deltametrina.

Figura 4 – Plano experimental adoptado no ensaio de toxicidade da mistura binária de deltametrina e nitrito, indicando as combinações de unidades tóxicas utilizadas.

Figura 5 – Curva de toxicidade aguda da deltametrina para *Daphnia magna*, obtida após 48 horas de exposição.

Figura 6 – Curva de toxicidade aguda dos nitritos para *Daphnia magna*, obtida após 48 horas de exposição.

Figura 7 – Efeitos das exposições simples à deltametrina (A) e ao nitrito (B) efectuadas em simultâneo com o ensaio de mistura (valores médios).

Figura 8 – Efeito da mistura binária de deltametrina e nitrito na sobrevivência de *D. magna*. À esquerda apresenta-se a relação entre os dados observados e os valores previstos pelo modelo de acção independente (A) e pelo modelo de desvio ao AI dependente da razão entre componentes (C), utilizando o modelo MixTox. A linha diagonal representa a concordância máxima entre dados observados e previstos pelos modelos ajustados. À direita apresentam-se os resíduos dos dados obtidos para a mistura após ajuste do modelo respectivo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do meio sintético água dura ASTM (adaptado de Guilhermino, 1996).

Tabela 2 – Composição química do meio MBL utilizado na cultura de *C. Vulgaris* (adaptado de Guilhermino, 1996).

Tabela 3 – Valores de temperatura (T), pH, concentração de oxigénio dissolvido (OD) e condutividade medidos durante o ensaio de toxicidade aguda da simazina para *D. magna* a 20 °C. Os valores apresentados correspondem à média e respectivos erros padrão das leituras efectuadas para cada concentração.

Tabela 4 – Valores de temperatura (T), pH, concentração de oxigénio dissolvido (OD) e condutividade medidos durante o ensaio de toxicidade aguda da simazina para *D. magna* a 25 °C. Os valores apresentados correspondem à média e respectivos erros padrão das leituras efectuadas para cada concentração.

Tabela 5 – Parâmetros de toxicidade obtidos após 48 horas de exposição para os ensaios de toxicidade aguda da simazina para *D. magna* realizados a 20 °C e a 25 °C. CENO, concentração de efeito não observado; CEO, concentração de efeito observado; Declive, declive da regressão linear estimada pela análise Probit; CL10, CL50 e CL90, concentrações letais a 10 %, 50 % e 90 %, respectivamente; IC95%, intervalo de confiança a 95%. Todos os valores de concentração são apresentados em mg/L..

Tabela 6 – Valores de temperatura (T), pH, concentração de oxigénio dissolvido (OD) e condutividade medidos durante o ensaio de toxicidade aguda da deltametrina para *D. magna*. Os valores apresentados correspondem à média e respectivos erros padrão das leituras efectuadas para cada concentração.

Tabela 7 – Valores de temperatura (T), pH, concentração de oxigénio dissolvido (OD) e condutividade medidos durante o ensaio de toxicidade aguda do nitrito para *D. magna*. Os valores apresentados correspondem à média e respectivos erros padrão das leituras efectuadas para cada concentração.

Tabela 8 – Parâmetros de toxicidade obtidos após 48 horas de exposição para os ensaios de toxicidade aguda da deltametrina e do ião nitrito para *D. magna*. CENO, concentração de efeito não observado; CEO, concentração de efeito observado; Declive, declive da regressão linear estimada pela análise Probit; CL10, CL50 e CL90, concentrações letais a 10 %, 50 % e 90 %, respectivamente; IC95%, intervalo de

confiança a 95%. Os valores de concentração são apresentados em $\mu\text{g/L}$ para a deltametrina e em mg/L para o nitrito.

Tabela 9 – Parâmetros da curva de concentração-resposta e valores de EC_{50} obtidos para os efeitos simples da deltametrina ($\mu\text{g/L}$) e do nitrito (mg/L) na sobrevivência de *D. magna*, medidos em simultâneo com o ensaio de mistura efectuado.

Tabela 10 – Resultados da análise do efeito da deltametrina e dos nitritos na sobrevivência de *D. magna*. Max , resposta para os grupos controlo; β , declive da curva individual de concentração-resposta; EC_{50} (em $\mu\text{g/L}$ para a deltametrina e em mg/L para os nitritos), concentração efectiva a 50%; a , b_{del} e b_{NC} , parâmetros das funções de desvio ao modelo de referência; SS , soma do quadrado dos desvios; χ^2 , estatística teste; $g.l.$, graus de liberdade; $p(\chi^2)$, significância do teste de razão de verosimilhanças. S/A, sinergismo/antagonismo; NC, desvios ao modelo de referência dependentes do nível de concentração; DR, desvios ao modelo de referência dependentes da razão entre componentes da mistura; n.a., o parâmetro não se aplica ao modelo em questão.

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS

I.1. Introdução geral

A presença de agentes tóxicos nos ecossistemas aumentou muito nos últimos anos, principalmente nos ambientes aquáticos. Os ecossistemas aquáticos são o destino final de muitas substâncias tóxicas sejam elas naturais ou provenientes de fontes de contaminação antropogénicas (Altindang *et al.*, 2008). Dentro dessa complexa mistura, há uma quantidade variada de vida vegetal e animal, desde o fitoplâncton e o zooplâncton, até à baleia azul (o maior mamífero do planeta). Dentro dessa gama de variadas formas de vida, há ainda a considerar organismos, como por exemplo insectos, que dependem da água para completar o seu ciclo de vida. Enfim, a água é uma componente vital no sistema de sustentação da vida na Terra. A sua poluição pode diminuir a sobrevivência de todos estes seres, causando também graves consequências ao Homem (Zampieron *et al.*, 2008).

Alguns processos geodinâmicos podem provocar alterações nas características da água, sendo frequentemente considerados como causadores de poluição de origem natural (Mendes e Oliveira, 2004). A poluição hídrica pela acumulação de metais pesados e diversos tipos de compostos orgânicos tóxicos pode ocorrer também pela descarga de resíduos provenientes de várias actividades antropogénicas (industriais, agrícolas,...) para os cursos de água natural. Esta última constitui uma das principais formas de poluição antropogénica de águas naturais subterrâneas e superficiais, incluindo estuários e zonas costeiras. Estes compostos podem contaminar a água e os sedimentos, e ser incorporados nas cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos. Para além disso, podem sofrer bio-acumulação e originar efeitos deletérios nos organismos aquáticos, interferindo com vários sistemas de órgãos e funções essenciais à vida.

Embora os resíduos orgânicos sejam biodegradáveis, a sua descarga para águas naturais pode provocar a eutrofização de ecossistemas aquáticos com conseqüente diminuição de oxigénio dissolvido e alteração de outros factores abióticos com grande influência na sobrevivência e desempenho dos organismos aquáticos (Ottoni, 1999). Alguns exemplos destes factores são o pH, a temperatura, a condutividade, as concentrações de iões fosfato, amónio, nitrito e nitrato. Por exemplo, uma diminuição do pH da água promove o

aumento da solubilização de certos metais, aumentando os riscos de toxicidade para os organismos aquáticos (Ottoni, 1999). Para além de poderem diminuir a qualidade da água estas condições podem também gerar a proliferação de microorganismos patogénicos responsáveis pela transmissão de doenças como a cólera, a febre tifóide, a desintéria bacilar, entre outras. A poluição das massas de água pode também trazer prejuízo ao lazer do ser humano (banhos, desportos aquáticos) (Ottoni, 1999).

A agricultura é uma das principais actividades consumidoras de águas de abastecimento; alguns milhões de km² de terras são irrigados no mundo, verificando-se um aumento anual deste valor de cerca de 8% ao ano. É também uma das principais actividades humanas que contribui para o aumento da poluição aquática devido à utilização de pesticidas (no solo e aspergidos no ar) e fertilizantes que acabam por atingir as águas naturais tanto por infiltração nos terrenos como por escorrência de águas residuais e lixiviação dos solos pelas águas pluviais. Estas substâncias contribuem para a intensificação dos processos de eutrofização dos ecossistemas aquáticos, são regra geral tóxicas para organismos não alvo e podem sofrer bio-acumulação na cadeia alimentar (Ottoni, 1999). Esta situação favorece a proliferação de bactérias decompositoras que consomem oxigénio, contribuindo para a diminuição da sua concentração na água e aumentam as concentrações de nitritos e nitratos. Estes processos também afectam as formas superiores de vida animal e vegetal, que utilizam o oxigénio na respiração, além das bactérias aeróbias, que são impedidas de decompor a matéria orgânica através do consumo de oxigénio (Zampieron e Vieira, 2008).

Ainda sobre a contaminação originada pelas actividades agrícolas há a considerar adicionalmente a influência de resíduos derivados da utilização de produtos agrotóxicos (comuns na agropecuária), que provêm de uma prática muitas vezes intensiva nos campos. Estes também levam frequentemente à forte contaminação dos cursos de água através da lixiviação dos campos agrícolas pela água das chuvas, o mesmo ocorrendo com a eliminação do esterco de animais criados em pastagens (Zampieron e Vieira, 2008).

Por sua vez a poluição atmosférica tem sido a responsável pela libertação de grandes quantidades de óxidos de nitrogénio, carbono e enxofre para a atmosfera provenientes de actividades industriais e veículos motorizados, originando em associação com a humidade do ar, a formação de ácidos. A precipitação deste material no solo e nas águas, conhecida como

chuva ácida, pode danificar o solo e a vegetação terrestre, bem como produzir acidificação das massas de água próximo das áreas industrializadas pelo Homem, podendo inclusive, se em concentrações elevadas, provocar um aumento de mortalidade de várias espécies de peixes. O excesso de dióxido de carbono libertado para a atmosfera pelas actividades humanas (e.g., queima de combustíveis fósseis, queimadas) está na origem do aumento global da temperatura do planeta pela absorção dos raios infra-vermelhos do sol (efeito estufa). Enfim, a poluição das águas pode aparecer de vários modos, incluindo a poluição térmica devida à descarga de efluentes com temperatura elevada para os ecossistemas aquáticos (Zampieron e Vieira, 2008).

A contaminação do meio ambiente por pesticidas é um dos maiores problemas ambientais detectando-se um aumento continuado do número e concentração de pesticidas na água (Palma *et al.*, 2009). Vários pesticidas, a maior parte herbicidas e insecticidas, tornaram-se contaminantes comuns nas águas superficiais por causa da sua grande aplicação na agricultura e em zonas habitacionais (Liu *et al.*, 2009). A preocupação com a contaminação por pesticidas, em águas de origem superficial e subterrânea tem crescido no meio científico (De Lamonica – Freire *et al.*, 2001, Palma *et al.*, 2009), em parte devido à falta de informação sobre os impactos que estes compostos químicos utilizados na agricultura possam causar nos sistemas aquáticos (Nakagome *et al.*, 2006). Vários estudos desenvolvidos em diferentes regiões do mundo têm demonstrado a ocorrência de vários pesticidas persistentes tanto em águas superficiais como subterrâneas (De Lamonica – Freire *et al.*, 2001). Em Portugal, um estudo de monitorização química de 256 amostras de águas fluviais, estuarinas e costeiras provenientes de todo o país, analisadas durante um período de 6 meses para a presença de 72 compostos orgânicos semi-voláteis, indicou como compostos frequentemente detectados os pesticidas atrazina, simazina, irgarol, terbutilnazina, alaclor, metolaclor, pentaclorofenol, propanil, malatião e lindano (Tauler *et al.*, 2001).

Os factores abióticos como por exemplo a temperatura, o pH, a concentração de oxigénio dissolvido na água, e as concentrações de amónia, nitritos e nitratos podem também constituir factores de stresse para os organismos aquáticos. Estes são factores relevantes para o desenvolvimento e manutenção das diferentes espécies. Contudo, quando alterados relativamente aos valores óptimos característicos de cada espécie podem influenciar tanto as suas respostas fisiológicas, e o seu crescimento e reprodução, como a

toxicidade de diferentes compostos químicos, incluindo pesticidas, para os organismos aquáticos. As substâncias químicas e estes factores ambientais podem interagir de várias formas, que resultam frequentemente na alteração da sua biodisponibilidade e características toxicocinéticas.

A temperatura é um factor particularmente importante dadas as alterações globais que se estão actualmente a verificar-se no planeta e a sua influência na fisiologia dos animais aquáticos. Efectivamente, as concentrações dos gases de efeito estufa na atmosfera terrestre têm sofrido um aumento progressivo nos últimos 150 anos, que se tornou mais acentuado nas últimas cinco décadas. Considerando as alterações mais relevantes, os aumentos foram de $31 \pm 4\%$ para o CO_2 ; $150 \pm 25\%$ para o CH_4 ; $17 \pm 5\%$ para o N_2O . Por sua vez, estudos indicam que o ozono na troposfera sofreu um aumento de cerca de $35 \pm 1\%$ entre 1750 e 2000, dependendo da região considerada, e decresceu na estratosfera no período entre 1970 a 2000 (Salati *et al.*, 2006). Em consequência, as previsões globais para o século XXI indicam um aumento de temperatura de 1.4 a 5.8°C, só na primeira metade do próximo século (Leão, 2000). Simulações de modelos globais utilizando diferentes cenários prevêm ainda um aumento na média das concentrações de vapor de água na atmosfera, e também um aumento global da precipitação no século XXI (Salati *et al.*, 2006). Estas mudanças nos padrões meteorológicos deverão manifestar-se pela ocorrência de secas em zonas produtivas e fortes chuvas nos frágeis desertos (Leão, 2000). Poderá ainda haver mudanças na agricultura, nos recursos hídricos, na pesca, no uso da energia e na vida das cidades litorais, acelerando a extinção de inúmeras espécies de plantas e animais (Leão, 2000).

Para além dos aspectos mencionados, há ainda a considerar que a maioria dos organismos aquáticos são ectotérmicos, pelo que a sua temperatura corporal depende da temperatura ambiente. A influência da temperatura na toxicidade de compostos químicos, incluindo pesticidas, tem sido estudada em várias espécies de crustáceos e peixes. De uma forma geral, a toxicidade dos compostos químicos aumenta com o aumento de temperatura da água, e a exposição a substâncias tóxicas parece diminuir a capacidade dos organismos para se adaptarem ao aumento de temperatura (Heugens *et al.*, 2001). Contudo, para os pesticidas, as respostas observadas parecem variar em função do composto e da sensibilidade da espécie ao composto e à alteração da temperatura na água, tendo sido encontradas correlações

positivas e correlações negativas entre a temperatura e a sua toxicidade, ou mesmo nenhuma relação entre ambos (Heugens *et al.*, 2001).

De entre os elementos necessários à vida e essenciais ao desenvolvimento das plantas e de animais, destaca-se, pela sua participação na constituição de muitas das suas moléculas essenciais, o azoto (Mendes e Oliveira, 2004). Os múltiplos e variados compostos azotados ligados à vida, tais como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc., dão lugar no decurso dos processos de biodegradação, à formação de compostos progressivamente mais oxidados, que culminam com o ião nitrato. Em particular, a amónia, os nitritos e os nitratos são comuns em ecossistemas aquáticos de todo o mundo, como componentes naturais do ciclo do azoto (Lewis Jr e Morris, 1986). De entre estes, a ocorrência de nitritos (NO_2^-) resulta de processos de oxidação do azoto amoniacal ou da redução de nitratos por processos bacterianos de nitrificação e desnitrificação. Na água em condições oxidativas naturais, a concentração de nitritos é normalmente inferior a 0,005 mg/L (Lewis Jr e Morris, 1986; Mendes e Oliveira, 2004). Contudo, a concentração a sua concentração em ecossistemas aquáticos tem aumentado bastante nas últimas décadas, em consequência do aumento da poluição de origem antropogénica. A descarga para os ecossistemas aquáticos de águas residuais de origem industrial, de esgotos provenientes de zonas urbanas e de produções de aquacultura, a escorrência de águas residuais agrícolas, bem como a lixiviação de campos agrícolas, são as fontes de poluição mais importantes que têm contribuído para este aumento (Jensen 2003). Por outro lado, a perda de flora nitrificadora resultante da acção tóxica de vários compostos químicos, em especial antibióticos, introduzidos também por estas vias pode contribuir para a acumulação de grande quantidades de nitritos em águas naturais (Jensen 2003).

A presença de nitritos na água em concentrações elevadas constitui um problema ambiental grave uma vez que este anião é particularmente tóxico para os animais aquáticos (Camargo e Alonso, 2006). Sabe-se que em peixes e crustáceos, os nitritos são absorvidos através do epitélio das brânquias, podendo acumular-se nos tecidos e fluidos corporais em concentrações elevadas, causando várias alterações fisiológicas (Jensen, 2003; Camargo e Alonso, 2006), entre elas a disfunção dos pigmentos transportadores de oxigénio. Em peixes, os nitritos absorvidos produzem a oxidação da hemoglobina em metahemoglobina, uma forma incapaz de transportar o

oxigénio, causando hipoxia e morte; nos invertebrados aquáticos, em que a molécula transportadora de oxigénio é a hemocianina, os nitritos oxidam o cobre desta molécula originando também depleção de oxigénio e morte dos organismos (Jensen, 2003; Carmago e Alonso, 2006).

Os ensaios ecotoxicológicos permitem avaliar os efeitos adversos de uma substância tóxica ou de uma mistura complexa para organismos aquáticos (Cooney, 1995; Walker *et al.*, 2001). Nestes ensaios os organismos teste são em geral expostos a várias soluções de concentrações diferentes preparadas com a substância de interesse. Os seus resultados são úteis para determinar os efeitos tóxicos nos organismos, compreender o seu modo de acção. Quando realizados com amostras de água recolhidas em locais potencialmente poluídos os seus resultados contribuem para a identificação de áreas contaminadas e ajudam a delinear medidas adequadas à minimização do impacto dessa contaminação e à conservação das populações afectadas. A sua grande relevância deve-se, por um lado, ao facto de as análises químicas permitirem determinar a concentração de uma dada substância na água mas não fornecerem informação sobre a sua biodisponibilidade nem sobre os efeitos tóxicos que essa substância e/ou as concentrações encontradas podem provocar nos seres vivos. Na utilização de ensaios ecotoxicológicos para avaliação, previsão ou detecção de potenciais efeitos tóxicos nos seres vivos os efeitos observados são efectivamente induzidos pelas substâncias que estão biodisponíveis (Laitano e Matias, 2006). Por outro lado, no caso de misturas complexas, como acontece geralmente na maioria dos locais contaminados, os resultados das análises químicas tornam-se ainda mais difíceis de interpretar em termos de possíveis efeitos ecotoxicológicos, uma vez que a toxicidade destas misturas pode depender de interacções que ocorrem entre as diferentes espécies químicas em solução e de efeitos cumulativos nos organismos (Walker *et al.*, 2001). Efectivamente, numa mistura complexa de compostos químicos, podem ocorrer interacções entre as diferentes espécies químicas que originam efeitos tóxicos sinérgicos ou antagonísticos, por exemplo. Estes efeitos não podem ser quantificados por métodos analíticos como a determinação da concentração química de cada composto.

Os ensaios ecotoxicológicos clássicos dividem-se em ensaios de toxicidade aguda e de toxicidade crónica (Cooney, 1995), e seguem protocolos padronizados desenvolvidos por organizações internacionais como por exemplo a EPA e a OCDE. Os ensaios de toxicidade aguda são dos mais

utilizados para avaliação da toxicidade de substâncias químicas e de efluentes (Guilhermino *et al.*, 1996). Estes ensaios têm um curto período de duração relativamente à duração do ciclo de vida da espécie, e o parâmetro indicativo de toxicidade mais frequentemente utilizado é a morte, expressa pela concentração letal mediana (CL50), ou concentração do tóxico que provoca a morte de 50% dos organismos testes nas condições específicas de realização do ensaio (Cooney, 1995; Walker *et al.*, 2001).

Alguns dos organismos teste mais comumente utilizados nestes ensaios incluem algas unicelulares, espécies de microcrustáceos, como por exemplo *Daphnia magna*, e peixes (Cooney, 1995). Em particular *Daphnia magna*, é um cladóceros de água doce que apresenta características bastante favoráveis à realização de ensaios ecotoxicológicos, sendo utilizado por um grande número de autores (Guilhermino 1996; Guilhermino *et al.*, 1996; Diamantino *et al.*, 2000, 2001; Ferreira *et al.*, 2008). Algumas destas características mais importantes são: i) o seu curto ciclo de vida, relativamente a outras espécies de organismos aquáticos e o seu tamanho, que embora suficientemente pequeno para diminuir o material necessário à execução dos ensaios e os resíduos produzidos, permite o manuseamento e manutenção fáceis de culturas laboratoriais e a observação efectiva de vários parâmetros a olho nú; ii) a capacidade de reprodução partenogenética, que permite controlar a variabilidade de origem genética nos ensaios realizados e facilita a obtenção de organismos teste em elevado número durante todo o ano; e a elevada sensibilidade às substâncias tóxicas em geral e a factores abióticos (Peters e De Bernardi, 1987; Guilhermino 1996). Para além disso, como consumidor primário, esta espécie ocupa uma posição chave nas cadeias alimentares de ecossistemas dulciaquícolas. Pelos aspectos mencionados *D. magna* foi a espécie escolhida para a realização do presente trabalho.

I.2. Objectivos

Este trabalho teve por objectivo principal estudar os efeitos ecotoxicológicos de dois pesticidas e da sua combinação com factores abióticos no microcrustáceo *Daphnia magna*. Os pesticidas seleccionados para o estudo foram a simazina, um herbicida da classe das triazinas, e a deltametrina, um insecticida piretróide de quarta geração, pela sua intensa utilização respectivamente no controlo de ervas daninhas e de infestações por artrópodes. Os factores abióticos estudados foram a temperatura, pela sua influência na fisiologia dos organismos e importância em termos das alterações globais actualmente em curso, e a concentração de nitritos na água, um componente natural do ciclo do azoto cuja concentração nos ecossistemas aquáticos tem vindo sucessivamente a aumentar para valores capazes de provocar efeitos tóxicos nos seres vivos, em consequência do aumento da contaminação aquática de origem antropogénica. Os objectivos específicos do trabalho consistiram em: i) avaliar a toxicidade aguda da simazina às temperaturas de 20 e 25 °C, respectivamente uma temperatura adequada ao ciclo de vida de *D. magna* e uma temperatura para a qual se verifica uma diminuição da duração do seu ciclo de vida; ii) avaliar e prever a toxicidade aguda de uma mistura binária de deltametrina e nitritos.

De acordo com os objectivos estabelecidos, o primeiro capítulo desta dissertação consiste numa introdução geral às questões da contaminação de origem antropogénica por pesticidas, da importância e influência de factores abióticos na toxicidade dos compostos químicos, e da escolha do organismo teste utilizado. No segundo capítulo apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda realizados com o pesticida simazina às temperaturas de 20 e 25° C. No terceiro capítulo apresentam-se os resultados do ensaio avaliação da toxicidade de uma mistura binária de deltametrina e nitritos, tendo por base o modelo de teórico de acção independente. E, no quarto capítulo apresenta-se uma discussão geral e conclusões dos resultados obtidos no trabalho desenvolvido.

CAPÍTULO II. EFEITO DA TEMPERATURA NA TOXICIDADE AGUDA DA SIMAZINA PARA *D. MAGNA*

II.1. Introdução

Nos dias que correm, conflitos entre a produção agrícola e a qualidade ambiental são cada vez maiores, incidindo no uso de agroquímicos e pesticidas, e nos seus potenciais efeitos adversos para organismos não alvo. Os pesticidas são compostos químicos, ou misturas de compostos químicos, que visam destruir ou controlar os efeitos de pragas. Estas podem ser plantas indesejáveis, animais ou ainda microrganismos.

De acordo com a função e o organismo alvo, os pesticidas podem ser de vários tipos, nomeadamente: bactericidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, insecticidas, avicidas, rodenticidas (Klaasen e Watkin, 2001). Numa situação ideal, os pesticidas devem apresentar toxicidade selectiva destruindo os organismos alvo sem produzir efeitos nefastos em organismos não alvo que possam eventualmente sofrer exposição. Contudo, na realidade a maioria dos tóxicos não são assim tão selectivos, podendo provocar tanto efeitos agudos (*e.g.*, alteração da taxa de sobrevivência) como crónicos (*e.g.*, diminuição das taxas de crescimento e reprodução) em espécies não alvo (Klaasen e Watkin, 2001; Palma *et al.*, 2009).

Conforme mencionando anteriormente, os pesticidas podem entrar no meio aquático através da libertação accidental, mas sobretudo pela infiltração nos terrenos para águas subterrâneas, pela escorrência de águas residuais agrícolas não tratadas para os ecossistemas aquáticos, ou por lixiviação dos solos por acção das águas pluviais. Os pesticidas também podem ser aplicados directamente na água para controlo de pragas. Ao atingir os ecossistemas aquáticos os pesticidas podem actuar directamente sobre os organismos não alvo, ou indirectamente por alteração do seu habitat ou interferindo com a cadeia alimentar por bioacumulação em organismos de diferentes níveis tróficos (Nakagome *et al.*, 2006).

Os animais aquáticos são expostos aos pesticidas através da ingestão de alimento contaminado, pelo contacto com sedimentos contaminados, por absorção através das brânquias (Nakagome *et al.*, 2006). A toxicidade destes compostos vai depender sobretudo de propriedades como a sua solubilidade na água, persistência, produtos de degradação que origina, potencial de

bioacumulação, interacção com outros compostos tóxicos presentes na água e com factores abióticos da água. Por exemplo, embora a sua degradação e/ou metabolização nos organismos dê frequentemente origem à formação de subprodutos menos tóxicos, nem sempre isso se verifica, podendo os metabolitos formados apresentar maior toxicidade para os organismos do que os compostos parentais. É este o caso do paratião que sofre bioactivação nos organismos vivos originando o paraoxão, um metabolito que apresenta um efeito inibidor da actividade da enzima acetilcolinesterase mais elevado do que o composto parental (Guilhermino *et al.*, 1996).

Dentro dos pesticidas, as substâncias mais utilizadas como herbicidas, compreendem, fundamentalmente, as triazinas (atrazina, simazina, etc.). Este grupo de pesticidas é bastante utilizado na produção agrícola, podendo ainda ser encontrados vestígios junto às estradas, onde são usadas no controlo de ervas infestantes (Klaasen e Watkin, 2001). Actuam por inibição do processo de fotossíntese, impedindo o crescimento dos órgãos das plantas, pelo que algumas substâncias deste grupo também são usadas como algicidas (Ware e Whitacre, 2004). Em particular a simazina, 2-cloro-4,6-bis (etilamino) -s-triazina (Figura 1), é bastante utilizada no controlo da infestação por ervas daninhas tanto de vinhas como de culturas de azeitona, milho e arroz, árvores de fruto e ainda em plantas ornamentais, tais como as orquídeas, e na produção de árvores de Natal (Strandberg e Scott-Fordsmand, 2002). Mais recentemente, tem sido também utilizada para fins não agrícolas, nomeadamente no controlo de infestações, por exemplo, em bermas de estradas e campos de golfe.

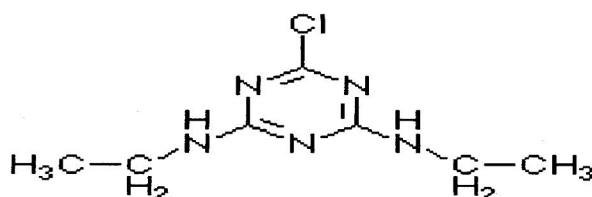


Figura 1. Fórmula estrutural da Simazina. (Strandberg e Scott-Fordsmand, 2002).

A simazina é uma das triazinas mais utilizadas no mundo inteiro pelo que tem também grande impacto na economia mundial (Kim *et al.*, 2002). Esta grande utilização faz com que muitos organismos não alvo sejam também

expostos, tanto a nível terrestre como nas áreas aquáticas adjacentes (Strandberg e Scott-Fordsmand, 2002). Apesar da baixa solubilidade da simazina na água, resíduos deste herbicida são frequentemente encontrados em águas superficiais e em reservatórios de águas (De-Lamonica-Freire *et al.*, 2001).

Na Península Ibérica tem sido detectada tanto em Espanha como em Portugal. Em Espanha, em cidades da Estremadura foram detectadas concentrações de 4,5 µg/L em águas para consumo humano (Oropesa *et al.*, 2009). Em Portugal, um estudo relativo aos anos de 1983 a 1993, mostrou que os resíduos de vários pesticidas, incluindo a simazina, determinados em amostras de água da bacia do Tejo se mantiveram relativamente constantes ao longo deste período e abaixo do limite máximo admissível por legislação (0.1 µg/L) (Cerejeira *et al.*, 2000). Contudo as concentrações na água de cada pesticida, em particular, apresentaram variação sazonal, atingindo valores mais elevados, acima do limite máximo admissível, na Primavera, na sequência do tratamento de culturas de milho e arroz. De Março a Novembro de 1993 a simazina foi também detectada em 3 das estações de amostragem no Rio Guadiana, atingindo 0.3 µg/L (Cerejeira *et al.*, 2000).

Estima-se ainda que durante o ano de 1996 cerca de 22000 toneladas de simazina terão sido utilizados em culturas de vinha, milho e arroz (Azevedo *et al.*, 2000). Para além disso, a presença de resíduos deste herbicida foi detectada em amostras de águas fluviais, estuarinas e costeiras recolhidas de Norte a Sul de Portugal Continental, durante um período de seis meses em 1999 (Azevedo *et al.* 2000; Tauler *et al.*, 2001). Neste estudo, as concentrações encontradas variaram entre 0.05 e 0.74 µg/L, e a simazina foi principalmente detectada em locais do rio Guadiana, nomeadamente em Monte da Vinha, Pulo do Lobo e Cais de Alcoutim (Tauler *et al.*, 2001). Também neste caso se observou variação sazonal das concentrações de resíduos encontradas, verificando-se um aumento de simazina durante o mês de Setembro, tendo o valor máximo determinado sido de 2.3 µg/L (Tauler *et al.*, 2001). Este mesmo herbicida foi também encontrado em amostras de águas subterrâneas provenientes de duas zonas agrícolas portuguesas (Batista *et al.*, 2002), enquanto que um estudo mais recente detectou a sua presença em amostras de sedimentos recolhidas em ecossistemas fluviais, estuarinos e costeiros de Portugal continental (Villaverde *et al.*, 2008).

Relativamente aos seus efeitos nos seres vivos, toxicidade elevada da simazina foi observada para fitoplâncton. Para além disso, estudos ecotoxicológicos têm demonstrado a manifestação de efeitos adversos após a exposição a este herbicida em organismos não alvo como insectos, zooplâncton, crustáceos e algumas espécies de peixe como por exemplo a carpa (Strandberg e Scott-Fordsmand, 2002; Wan *et al.*, 2006; Oropesa *et al.*, 2009).

A simazina foi o pesticida escolhido para a realização do trabalho apresentado neste capítulo, quer por ser um herbicida de uso generalizado, cujos resíduos na água e em sedimentos têm sido encontrados em ecossistemas aquáticos de vários países do mundo, incluindo Portugal, quer por apresentar efeitos tóxicos para organismos não alvo.

A temperatura é um factor abiótico que pode influenciar a toxicidade de várias substâncias químicas. O aumento da temperatura da água pode influenciar tanto a sua toxicidade como a tolerância dos organismos aquáticos a esses compostos (Heugens *et al.*, 2001). Prosser em 1991 propôs que o stresse térmico actua nas membranas neuronais, frequentemente acompanhado por hipoxia dos tecidos (Heugens *et al.*, 2001). A exposição a tóxicos pode aumentar as necessidades metabólicas em oxigénio. Por outro lado, o aumento de temperatura pode potenciar o efeito tóxico não só por alteração das taxas metabólicas, mas também das actividades locomotora e alimentar dos organismos, influenciando em consequência as taxas de eliminação e de destoxificação (Heugens *et al.*, 2001). Por exemplo, num estudo realizado por Fisher e Wadleighem (1985), os autores concluíram que o aumento da temperatura diminuía a tolerância de *Chironomus riparius* ao insecticida lindano, tendo observado valores de CL50 às 24 horas de 13.43, 6.63, e 6.77 mg/L às temperaturas de 15, 25, e 35 °C, respectivamente (Heugens *et al.*, 2001). Num outro estudo Song *et al.* (1997) testaram a influência de duas temperaturas na toxicidade de quatro herbicidas para *Daphnia magna* e para o insecto *Aedes aegypti* tendo concluído que ambas as espécies eram mais tolerantes à tebufenozida a 20 °C do que a 27 °C; enquanto que a 27 °C obtiveram valores de CL50 às 48 horas de 17.37 mg/L para *Daphnia magna* e 0.92 mg/L para *Aedes aegypti*, a 20 °C a mortalidade observada durante o período de teste foi inferior a 50%. Também neste estudo *Daphnia magna* foi mais tolerante ao aldicarb a 20 °C do que a 27 °C, com valores de CL50 às 48 horas de 0.74 e de 0.075 mg/L, respectivamente. No

entanto, os mesmos autores não observaram qualquer efeito da temperatura na toxicidade do dimetoato e do imidaclopride quer para *D. magna* quer para *A. aegypti* (Heugens *et al.*, 2001).

As espécies do género *Daphnia*, incluindo *D. magna*, são vulgarmente conhecidas por “pulgas de água” devido aos movimentos específicos das segundas antenas que dão a aparência de se deslocarem em pequenos saltos. Em particular *D. magna* é um pequeno cladóceros de água doce com cerca de 5 mm de comprimento que apresenta, como todos os crustáceos, uma carapaça que pode sofrer muda diária (Cooney, 1995; Guilhermino, 1996; Flohr *et al.*, 2005; Nakagome *et al.*, 2006).

Daphnia magna é um organismo filtrador, de ampla distribuição geográfica, que se alimenta de algas, bactérias e detritos orgânicos presentes na água e serve de alimento a várias espécies de peixes, ocupando por isso uma posição importante nas cadeias tróficas dos ecossistemas dulciaquícolas (Cooney, 1995). Durante a maior parte do ano as populações naturais de *Daphnia magna* são constituídas maioritariamente por fêmeas, sendo os machos apenas abundantes na Primavera e Outono ou quando ocorrem condições ambientais desfavoráveis como falta de alimento, baixas temperaturas ou grande densidade e subsequente acumulação de produtos excretores (Peters e De Bernard, 1987). Assim, em condições naturais, *Daphnia magna* reproduz-se por partenogénese cíclica, originando tanto clones geneticamente idênticos às fêmeas progenitoras como populações de constituição genética diferente (Cooney, 1995).

Este microcrustáceo tem sido amplamente utilizado como indicador biológico (Beatrici *et al.*, 2006; Laitano *et al.*, 2006). Para além das características já referidas, é sensível a uma grande variedade de substâncias tóxicas, sendo por isso um organismo padrão em ecotoxicologia comumente utilizado tanto em estudos com populações naturais como em ensaios com clones de laboratório para avaliação da toxicidade de xenobióticos em ambientes aquáticos (Guilhermino, 1996; Guilhermino *et al.* 1996; Barata *et al.*, 2001, 2002; Arauco *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2006; Altindag, *et al.*, 2008; Jo e Jung, 2008). Para esta utilização muito contribui também o pouco espaço necessário à manutenção de culturas laboratoriais, a menor quantidade de soluções teste e, conseqüentemente, resíduos tóxicos derivados dos ensaios realizados com este organismo, relativamente a outras espécies de crustáceos e a espécies de peixes.

No sentido de minimizar diferenças interlaboratoriais e permitir a comparação efectiva de resultados obtidos, várias organizações internacionais, incluindo a EPA e a OCDE, desenvolveram na década de 80 do século passado protocolos padronizados para a realização de ensaios de toxicidade aguda e toxicidade crónica com *D. magna*. Estes protocolos têm constituído a base de vários estudos realizados para avaliar a toxicidade tanto de compostos químicos como em mistura. Em França, por exemplo, *Daphnia magna* é também uma das espécies utilizadas para a monitorização de efluentes industriais, enquanto que nos Estados Unidos da América o uso desta espécie é recomendado pela Environmental protection Agency (EPA) para a realização de ensaios de avaliação da ecotoxicidade de compostos químicos usados na agricultura (Nakagome *et al.*, 2006). Esta espécie é um organismo padrão em ecotoxicologia que tem sido utilizada na avaliação da toxicidade de inúmeras substâncias tóxicas e efluentes contaminados. Foi por exemplo utilizada como organismo teste para o desenvolvimento de novos métodos de avaliação da toxicidade de substâncias químicas (Guilhermino, 1996; Guilhermino *et al.*, 1996). Em estudos realizados em 2002, Barata *et al.* estudaram as respostas sub-letais de diferentes clones, laboratoriais e de campo, em exposições simples e em mistura, de pesticidas e metais. Um outro estudo realizado por Arauco e colaboradores (2005) usou esta espécie para testar o efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon. Em 2006, Nakagome *et al.* testaram a toxicidade aguda de herbicidas e insecticidas usados na cultura do arroz para *Daphnia magna*. Mais recentemente este organismo foi utilizado para estudar a toxicidade da deltametrina utilizando NANOSIMS (Eybe *et al.*, 2009), os efeitos ecotoxicológicos da atrazina e do endossulfão (Palma *et al.*, 2009), e para avaliar a toxicidade de misturas binárias de cloreto de cádmio e carbendazina (Ferreira *et al.*, em 2008).

Pelas razões expostas, e pelo facto de as características desta espécie proporcionarem uma aclimação laboratorial relativamente fácil e rápida a temperaturas diferentes, *Daphnia magna* Strauss foi o organismo teste escolhido para a realização do presente trabalho. Os objectivos específicos consistiram no desenvolvimento e manutenção de culturas laboratoriais de *D. magna* às temperaturas de 20 e 25 °C para obtenção de organismos teste, e a realização de ensaios padronizados de toxicidade aguda para avaliação do potencial efeito da temperatura na toxicidade da simazina para *D. magna*.

II.2. Material e métodos

II.2.1. Cultura de *Daphnia magna*

Nos ensaios efectuados neste trabalho utilizaram-se apenas organismos provenientes do clone A (*sensu* Baird *et al.*, 1989a), mantido no Laboratório de Ecotoxicologia do ICBAS e do CIIMAR há vários anos. Para obtenção de juvenis a utilizar nos ensaios de toxicidade procedeu-se à elaboração e manutenção de culturas parentais individuais em recipientes de vidro de 200 mL de capacidade, parcialmente tapados, contendo 100 mL de meio água dura ASTM (ASTM, 1980) enriquecido com 0,4 mL de um suplemento orgânico de *Ascomyllum nodosum* (Baird *et al.*, 1989b) e um complexo vitamínico. As culturas foram iniciadas com organismos nascidos na 3^a ninhada e foram mantidas em sala climatizada com temperatura e fotoperíodo controlados, respectivamente a 20 ± 1 °C e 25 ± 1 °C e 16h luz: 8 horas escuro. Para cada organismo foi registado o dia do ciclo em que se iniciou a libertação de ninhadas e efectuou-se a contagem dos juvenis produzidos em cada ninhada. As culturas iniciais foram mantidas durante 3 ciclos de 3 ninhadas para selecção e manutenção em cultura das melhores progenitoras, cujos descendentes foram usados nos ensaios de toxicidade aguda. O meio foi renovado 3 vezes por semana em dias alternados. Para o efeito prepararam-se novos recipientes de cultura com meio e alimento frescos e as fêmeas e/ou juvenis foram transferidas do frasco de cultura com meio envelhecido para o frasco com meio fresco com o auxílio de uma pipeta de plástico. O alimento era constituído por uma suspensão de *Chlorella vulgaris*, correspondendo a uma ração diária de 3×10^5 células/mL. Em cada geração, as fêmeas foram mantidas até ao nascimento da quinta ninhada, altura em que foram rejeitadas, iniciando-se uma nova cultura com os juvenis nascidos. Os juvenis foram usados nos ensaios ecotoxicológicos quando nascidos na 3^a, 4^a ou 5^a ninhadas. Para os ensaios realizados à temperatura de 25 °C utilizaram-se apenas juvenis previamente aclimatizados à temperatura de 25 ± 1 °C durante pelo menos 3 gerações.

II.2.1.1. Meio de cultura

Utilizou-se um meio reconstituído designado por água dura ASTM com a adição suplementar de 2 mL de um complexo vitamínico por cada 20 L de meio. Na tabela 1 indica-se a composição do meio utilizado quer na manutenção de culturas laboratoriais de *D. magna* quer na realização de ensaios de toxicidade.

Tabela 1 – Composição química do meio sintético água dura ASTM (adaptado de Guilhermino, 1996).

Formula Química	Solução reserva (g/L)	Volume (mL) a utilizar por 20 L de água ultrapura
NaHCO ₃	19.2	200 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	24.6	200 ml
KCl	0.8	200 ml
CaSO ₄ .2H ₂ O	A preparar na altura 2.4 g / 20 L de água ultra-pura	

As três primeiras soluções foram preparadas em água ultra-pura com antecedência e armazenadas a 4 °C; a última solução foi sempre preparada no momento da preparação do meio de cultura.

II.2.1.2. Suplemento orgânico de *A. nodosum*

Este suplemento foi preparado por diluição de uma solução concentrada de *Ascophyllum nodosum* de modo a obter uma absorvância de 0.620, a um comprimento de onda de 400 nm, numa diluição de 1/10. Utilizou-se um espectrofotómetro de cubete Jenway 6405/Vis. Esta solução diluída foi mantida a 4 °C protegida da luz.

II.2.1.3. Alimento

A fonte de alimento para as culturas individuais de *D. magna* foi uma suspensão da microalga verde *Chorella vulgaris* que foi também cultivada e preparada no laboratório.

II.2.1.3.1. Cultura de *C. vulgaris*

Na cultura de *C. vulgaris* foram utilizados recipientes de vidro, de 10 litros de capacidade, com 4 litros de MBL preparado com água destilada e soluções de micro e macronutrientes (Tabela 2). Estes recipientes foram tapados com rolhas próprias que possuem três tubos de silicone: um tubo de arejamento, um tubo para regulação da pressão e um tubo para entrada de meio e saída de suspensão de algas. O meio MBL foi esterilizado por calor húmido em autoclave. Após arrefecimento até à temperatura ambiente adicionaram-se 0,5 mL de complexo vitamínico e 10 mL de inóculo líquido de *C. vulgaris*. As culturas foram permanentemente arejadas, com ar filtrado através de filtro de seringa 0,22 µm (Spritzen/Syringe- Filter) e foram mantidas em sala climatizada a 20 ± 1 °C em condições de luminosidade permanente. A partir do 7º dia, altura em que as culturas atingiam a fase exponencial, procedeu-se à sua renovação em dias alternados. Para esse efeito retirou-se por diferenças de pressão 2 L de suspensão de alga e adicionou-se 2 L de meio MBL. Cada cultura foi mantida desta forma por um período máximo de 30 dias. As soluções reserva de macronutrientes, micronutrientes e de tampão Tris foram preparadas em água ultra-pura de condutividade inferior a 5 µS/cm e armazenadas a 4 °C no frigorífico.

Para a preparação do complexo vitamínico utilizaram-se soluções reserva de vitamina B1 (tiamina HCl, 20 mg/L), vitamina H (biotina, 10 mg/L) e vitamina B12 (cianocobalina, 10 mg/L), das quais se retiraram respectivamente 2500 µL, 25 µL e 25 µL para um volume final de 500 mL de água ultra-pura. A solução assim obtida foi filtrada a vácuo através de um filtro de 0,2 µm (Spritzen/Syringe-Filter), e dividida em microtubos de 2 mL que depois foram congelados a -20 °C.

II.2.1.3.2. Preparação do alimento

Os volumes de suspensão de algas retirados da cultura de *C. vulgaris*, foram utilizados na preparação de alimento para *Daphnia magna*. Para este efeito, a suspensão foi primeiro centrifugada durante 7 minutos a 3500 rpm numa centrífuga Kubota 5400. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento de algas foi ressuspenso em meio água dura ASTM com vitaminas. A

absorvância da solução de algas foi medida num espectrofotómetro de cuvete (Jenway 6405/Vis), a um comprimento de onda de 440 nm numa diluição de 1/10 até se obter uma solução final com valor de absorvância entre 0.4 e 0.8. Esta solução de algas foi armazenada a 4 °C por um período máximo de 3 dias ou a -20 °C por um período máximo de 3 meses.

Tabela 2 – Composição química do meio MBL utilizado na cultura de *C. Vulgaris* (adaptado de Guilhermino, 1996).

Fórmula Química	Solução reserva (g/L)	Quantidade por meio (ml/L)
Macronutrientes		
CaCl ₂ .2H ₂ O	36.76	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	36.97	1
NaHCO ₃	12.6	1
K ₂ HPO ₄	8.71	1
NaNO ₃	85.01	1
NaSiO ₃ .5H ₂ O	28.42	1
Micronutrientes		
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4.36	1
FeCl ₃ .6H ₂ O	3.15	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01	1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.02	1
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01	1
MnCl ₂ .24H ₂ O	0.18	1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.01	1
Tampão		
Tris (pH 7.2) (hidroximetilaminometano)	250	2ml/L

II.2.2. Ensaios padronizados de toxicidade aguda

Todos os ensaios foram efectuados de acordo com o protocolo padronizado da OCDE (OCDE, 2004) para ensaios de toxicidade aguda com *D. magna* e conforme descrito em Guilhermino (1996). Especificamente, os ensaios foram elaborados em meio água dura ASTM (ASTM, 1980) e iniciados com juvenis nascidos nas 3^a a 5^a ninhadas, com idade superior a 6h e inferior a 24h. Durante os ensaios os organismos não foram alimentados e não foi fornecido o suplemento orgânico de *A. nodosum*. Em cada ensaio foram

expostos um total de 20 animais por concentração testada, distribuídos por 4 réplicas. Os animais foram expostos em recipientes de vidro de 200 mL de capacidade contendo cada um 50 mL de solução teste. Os ensaios decorreram em condições de temperatura e fotoperíodo constantes de 20 ± 1 °C e 16h luz: 8h escuro. Cada ensaio teve a duração de 48h. No seu início, e às 24 e 48h foram medidos o pH, a temperatura, o oxigénio dissolvido na água e a condutividade utilizando para o efeito um medidor multiparamétrico portátil WTW multi 340i e as sondas apropriadas (pH Sen Tix 41 and Tetracon 325). O critério de efeito quantificado foi a morte avaliada através da imobilização durante 15 segundos dos juvenis quando expostos a um estímulo luminoso. Desta forma determinou-se às 24 e às 48h quantos organismos se encontravam mortos, registando-se em folha adequada ao efeito o número de sobreviventes por réplica e por concentração. Para os ensaios realizados à temperatura de 25 °C, seguiu-se uma metodologia idêntica à descrita para os ensaios padronizados realizados a 20 °C, excepto terem sido mantidos a uma temperatura constante de 25 ± 1 ° durante as 48h de duração dos ensaios. O parâmetro de toxicidade estimado foi a CL50, ou concentração letal mediana, que corresponde à concentração que provoca a morte de 50% dos organismos teste nas condições experimentais utilizadas.

II.2.3. Soluções teste

Nos ensaios realizados a 20 e a 25 °C foi testada uma série de 6 concentrações diferentes de simazina (Sigma-Aldrich): 15.00, 7.50, 3.75, 1.88, 0.94 e 0.47 mg/L. As soluções teste com estas concentrações foram preparadas por diluição sucessiva de uma solução reserva de simazina em acetona (1500 mg/L) com meio água dura ASTM. Cada ensaio realizado incluiu ainda um controlo preparado apenas com meio água dura ASTM, e um controlo preparado com meio água dura ASTM e acetona, como solvente utilizado, na concentração mais elevada utilizada para preparar as soluções teste (< 1%). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

II.2.4. Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda realizados são apresentados sob a forma de médias e respectivos desvios padrão (DP), para o caso dos parâmetros físico-químicos registados ao longo dos ensaios, e sob a forma de percentagem de mortalidade por concentração testada. Os valores de CL50 e respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%) foram estimados através da análise Probit utilizando o método de Finney (1971) e o programa estatístico SPSS para Windows v16.0. Os valores de Concentração de Efeito Não Observado (CENO) foram determinados como a concentração testada mais elevada que não provocou mortalidade superior a 10%, conforme as normas da OCDE para a percentagem de mortalidade aceitável nos organismos controlo (OCDE, 2004). A Concentração de Efeito Observado (CEO) foi determinada como a concentração testada mais baixa que provocou mortalidade superior a 10%.

II.3. Resultados

Relativamente aos parâmetros físico-químicos medidos ao longo do período de duração dos ensaios, a concentração de oxigénio dissolvido foi sempre igual ou superior a 60% quer no ensaio realizado a 20 °C quer no ensaio realizado a 25 °C (Tabelas 3 e 4). A variação de pH nos recipientes teste não ultrapassou 1.5 unidades em nenhum dos casos. A temperatura registada sofreu uma variação inferior a 1 unidade, quer no ensaio a 20 °C quer no ensaio a 25 °C. A condutividade medida nos recipientes teste de diferente concentração foi de aproximadamente 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ no ensaio a 20 °C e 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$ no ensaio a 25 °C.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 2, não se observou mortalidade nos recipientes controlo nem nos recipientes controlo com solvente em nenhum dos ensaios realizados.

Tabela 3 – Valores de temperatura (T), pH, concentração de oxigénio dissolvido (OD) e condutividade medidos durante o ensaio de toxicidade aguda da simazina para *D. magna* a 20 °C. Os valores apresentados correspondem à média e respectivos erros padrão das leituras efectuadas para cada concentração.

Parâmetros	Concentração (mg/L)							
	C	C+S	0.47	0.94	1.88	3.75	7.50	15.00
T (°C)	19.7±0.17	19.9±0.28	20.3±0.50	20.3±0.51	20.1±0.47	20.1±0.47	20.1±0.44	20.0±0.39
pH	8.0±0.18	8.1±0.12	8.2±0.08	8.2±0.08	8.2±0.08	8.2±0.08	8.1±0.10	8.1±0.12
OD (%)	72.4±10.8	73.9±12.2	71.6±10.9	70.8±10.7	70.9±11.9	73±11.2	70.7±11.8	70.6±12.5
Condutividade (µS/cm)	498±15.0	493±8.0	491±7.0	493±4.0	496±6.0	498±4.0	496±8.0	500±4.0

Tabela 4 – Valores de temperatura (T), pH, concentração de oxigénio dissolvido (OD) e condutividade medidos durante o ensaio de toxicidade aguda da simazina para *D. magna* a 25 °C. Os valores apresentados correspondem à média e respectivos erros padrão das leituras efectuadas para cada concentração.

Parâmetros	Concentração (mg/L)							
	C	C+S	0.47	0.94	1.88	3.75	7.5	15.0
T (°C)	24.7±0.06	24.9±0.05	24.5±0.05	24.7±0.03	24.6±0.00	24.7±0.00	24.8±0.00	24.7±0.00
pH	7.9±0.52	8.1±0.33	8.3±0.06	8.3±0.05	8.3±0.06	8.3±0.09	8.3±0.13	8.2±0.22
OD (%)	85.5±2.50	86.9±1.20	85.9±3.20	86.8±2.30	84.6±3.70	85.1±3.80	84.5±2.90	86.5±2.80
Condutividade (µS/cm)	609±7.0	606±13.0	610±10.0	616±10.0	612±10.0	614±12.0	606±11.0	609±12.0

A mortalidade observada às 48 h nas soluções teste de simazina para o ensaio a 20 °C variou entre um mínimo de 5% para a concentração de 1.88 mg/L e um máximo de 40% para a concentração de 15 mg/L. Para o ensaio realizado a 25 °C observou-se um aumento da mortalidade, relativamente ao ensaio realizado a 20 °C. A mortalidade registada às 48 h variou entre um mínimo de 5 % para as concentrações de 0.47 e 1.88 mg/L e um máximo de 65% para a concentração de 15 mg/L, correspondendo a um aumento de 25 % de mortalidade na solução teste de concentração mais elevada. Na Tabela 5 apresentam-se os valores de CENO, CEO, CL10, CL50 e CL90 determinados às 48 horas. Relativamente a estes parâmetros, obtiveram-se valores de CENO e CEO mais elevados no ensaio realizado a 25 °C, relativamente ao ensaio realizado a 20 °C. Contudo, os valores de CL50 e CL90 às 48 h foram significativamente inferiores aos valores obtidos para estes parâmetros no ensaio a 20 °C, sugerindo uma maior toxicidade da simazina a temperatura mais elevada.

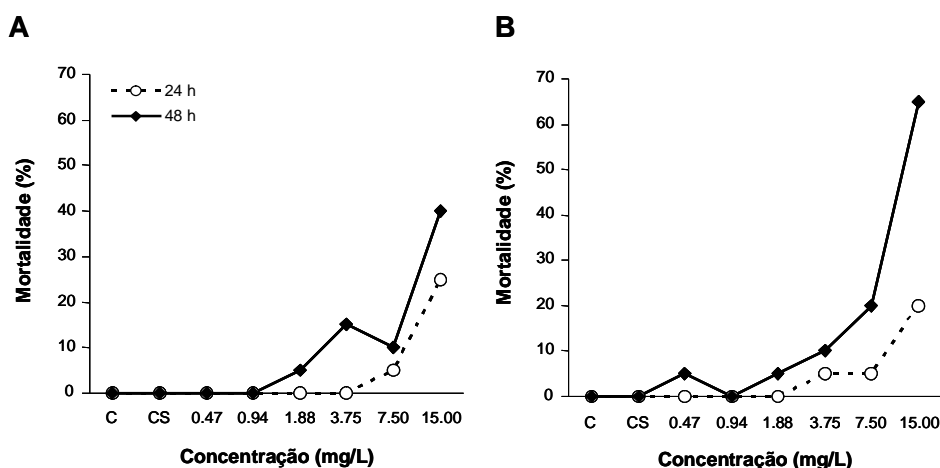


Figura 2 – Curvas de toxicidade aguda da simazina para *Daphnia magna*, às 24 e às 48 h, obtidas nos ensaios realizados a 20 °C (A) e a 25 °C (B).

Tabela 5 – Parâmetros de toxicidade obtidos após 48 horas de exposição para os ensaios de toxicidade aguda da simazina para *D. magna* realizados a 20 °C e a 25 °C. CENO, concentração de efeito não observado; CEO, concentração de efeito observado; Declive, declive da regressão linear estimada pela análise Probit; CL10, CL50 e CL90, concentrações letais a 10 %, 50 % e 90 %, respectivamente; IC95%, intervalo de confiança a 95%. Todos os valores de concentração são apresentados em mg/L.

Temperatura ensaio	CENO	CEO	Declive (IC95%)	CL10 (IC95%)	CL50 (IC95%)	CL90 (IC95%)
20 °C	1.88	3.75	1.6 (0.71-2.52)	4.1 (1.63-6.46)	24.9 (13.25-164.44)	155.4 (46.24-9758.56)
25 °C	3.75	7.5	2.5 (1.38-3.56)	3.7 (1.91-5.25)	12.3 (8.88-22.17)	40.7 (22.48-171.28)

II.4. Discussão

Trabalhos anteriores sobre a toxicidade aguda da simazina para microcrustáceos de água doce encontraram valores de CL50 às 48 horas de 92 mg/L, IC95%= (54-259 mg/L), para *D. pulex* (Fitzmayer *et al.*, 1982 in Strandberg e Scott-Fordsmand, 2002) e de 72 mg/L, IC95%= (59-87 mg/L) para *Ceriodaphnia dubia* (Foster *et al.*, 1998 in Strandberg e Scott-Fordsmand, 2002). Para *D. magna* o valor obtido neste trabalho, no ensaio realizado a 20 °C, é significativamente mais elevado do que o valor de 1.1 mg/L determinado por Munn *et al.* (2006). Em contrapartida, Wan *et al.* (2006) num trabalho em que testaram o *Princep*[®], um produto comercial cujo principal princípio activo é a simazina (89%), indicam que o seu valor de CL50 às 48 h para *D. magna* será superior a 1 g/L. Para a simazina de grau analítico estes mesmos autores referem não ter sido possível determinar o valor de concentração letal mediana para *D. magna* devido à sua baixa solubilidade quer em água quer em acetona. Efectivamente a solubilidade desta substância em água é 6.2 mg/L (HSDB, 1998). Embora seja mais facilmente solúvel em acetona o seu limite de solubilidade neste solvente também é relativamente baixo (1500 mg/L). Por outro lado, embora a solubilidade da simazina em acetona não seja muito elevada, é claramente superior aos valores de solubilidade de outras substâncias indicadas como possíveis solventes, e em particular de solventes adequados para utilização em ensaios ecotoxicológicos com *D. magna* (*e.g.*, 570 mg/L etanol; HSDB, 2008). Por estas mesmas razões, também não foi possível no presente trabalho testar soluções de concentração muito elevada.

A forte disparidade de valores encontrados na literatura, bem como as diferenças relativamente aos resultados obtidos neste trabalho, para os parâmetros de toxicidade aguda da simazina para *D. magna* podem dever-se à eventual utilização nos diferentes trabalhos de clones desta espécie com sensibilidades diferentes, ou ainda à eventual utilização de condições de cultura e de ensaio distintas.

No ensaio realizado à temperatura de 25 °C observou-se um aumento de 25 % da mortalidade observada para a solução teste de concentração mais elevada, comparativamente ao ensaio realizado a 20 °C. Este aumento de mortalidade reflectiu-se numa diminuição para metade do valor de CL50 às 48 h. Embora estes resultados sugiram um possível efeito da temperatura na toxicidade aguda da simazina, as diferenças observadas mantêm-se em termos

de ordem de grandeza (ppm) e os valores de CL50 encontrados quer a 20 quer a 25 °C são bastante superiores às concentrações de simazina detectados em amostras de águas naturais superficiais e subterrâneas tanto de Portugal como de Espanha (Azevedo *et al.*, 2000; Cerejeira *et al.*, 2000; Tauler *et al.*, 2001, Oropesa *et al.*, 2009).

CAPÍTULO III. TOXICIDADE AGUDA DE UMA MISTURA BINÁRIA DE DELTAMETRINA E NITRITOS PARA *D. MAGNA*

III.1. Introdução

Uma das principais classes de insecticidas é a que engloba os compostos piretróides sintéticos. Este grupo de substâncias químicas entrou em comercialização em 1980, e em 1982 já tinha uma cota de 30% do mercado global (Klaasen e Watkin, 2001), sendo actualmente o grupo de insecticidas mais disponível para os consumidores. Este tipo de insecticidas surgiu na sequência da necessidade de substituir os insecticidas organofosforados, criada pelas restrições impostas tanto nos Estados Unidos da América como noutros países do mundo (Meeker *et al.*, 2009).

Os piretróides surgem a partir do piretro, uma substância natural extraída de flores secas de piretro, ou crisântemo, e que actuam como neurotoxinas (Klaasen e Watkin, 2001; Wang *et al.*, 2009). Os piretróides sintéticos são componentes de produtos para controlo de parasitas de animais domésticos e de pragas de insectos típicos de culturas e colheitas agrícolas, e plantas de interior ou de jardim (Klaasen e Watkin, 2001; Wang *et al.*, 2009). Os principais princípios activos contidos no piretro são: as piretrinas I, ésteres do ácido crisantémico (piretrina I, cinerina I e jasmolina I); e as piretrinas II, ésteres do ácido pirétrico (piretrina II, cinerina II e jasmolina II). A piretrina I é o ingrediente mais activo na acção letal, apresentando toxicidade elevada para uma grande variedade de pragas de insectos domésticos, veterinários e típicos de colheitas armazenadas (Klaasen e Watkin, 2001). Quando atingem os ecossistemas aquáticos estes insecticidas podem induzir toxicidade em organismos não alvo, podendo causar efeitos letais e sub-letais (Wang *et al.*, 2009).

Um dos piretróides de utilização mais generalizada é a deltametrina, [1R-[1-(S*),3-]]-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de α -ciano-3-fenoxibenzilo (Figura 3). É sobretudo utilizada no controlo de pragas agrícolas provocadas por artrópodes, e devido à sua aplicação continuada ao longo dos anos os seus resíduos encontram-se frequentemente na água, em sedimentos e em tecidos de plantas e animais (Eybe *et al.*, 2009; Patro *et al.*, 2009). É um bloqueador dos canais de sódio das membranas neuronais, e um inibidor aminobutírico (Olson, 2006), considerado bastante tóxico para espécies não alvo, nomeadamente espécies de anfíbios, peixes, insectos, mexilhões e

microcrustáceos, como por exemplo *D. magna*; alguns autores sugerem ainda um papel como disruptor endócrino para este insecticida (Köprücü e Seker, 2008; Eybe et al, 2009). A deltametrina apresenta também neurotoxicidade para o Homem, provocando ataxia, falta de coordenação, hiperexcitabilidade, convulsões e paralisia, entre outros (Patro et al, 2009). Pelas características acima mencionadas de elevada utilização e detecção no ambiente aquático a deltametrina foi o pesticida seleccionado para este trabalho.

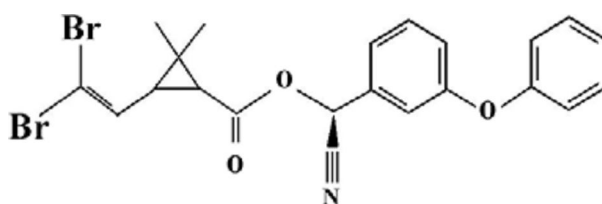


Figura 3. Fórmula estrutural da Deltametrina. (Eybe *et al.*, 2009).

A acumulação de nitritos nos ecossistemas aquáticos é um problema que tem vindo sucessivamente a avolumar-se. Um aumento na água deste ião tóxico para os organismos aquáticos pode surgir quer por excreção de compostos azotados pelos organismos aquáticos, quer devido ao excesso de nutrientes devidos a fenómenos de eutrofização, ou à perturbação das populações bacterianas envolvidas nos processos de nitrificação e desnitrificação. A poluição de origem antropogénica tem grande influência nestes processos, e o seu aumento continuado que se tem verificado ao longo dos últimos anos será o principal factor responsável por esta situação (Jensen, 2003; Camargo e Alonso, 2006).

Em vertebrados e invertebrados aquáticos verificou-se que os nitritos apresentam afinidade para o mecanismo de absorção do ião cloro pelas brânquias, pelo que quando em concentrações elevadas na água competem com este ião para ligação no transportador Cl^-/HCO_3^- (Jensen, 2003). Os nitritos causam os seus efeitos tóxicos principalmente no sangue de vertebrados ou na hemolinfa de organismos invertebrados por oxidação dos pigmentos transportadores de oxigénio para formas incapazes de transportar esta molécula de modo reversível. Em ambos os casos estes processos dão origem a situações de hipoxia nos organismos e morte dependendo da concentração de exposição (Jensen, 2003; Carmago e Alonso, 2006).

Considerando que diariamente são lançados para o ambiente aquático vários compostos tóxicos originados por diferentes actividades humanas, os organismos aquáticos não se encontram em geral expostos apenas a um único contaminante mas a uma mistura complexa de substâncias químicas com diferente potencial tóxico. Estas podem, para além disso, pertencer a grupos tão diferentes como os metais, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, fármacos e pesticidas vários. Para além disso podem contribuir para a alteração de factores abióticos na água com influência em funções fisiológicas essenciais dos seres vivos, como é o caso dos nitritos. O forte aumento da concentração deste factor abiótico em águas frequentemente contaminadas também com pesticidas levanta pois questões importantes sobre quais os efeitos tóxicos que poderão resultar da exposição combinada a nitritos e a um pesticida como a deltametrina.

O conhecimento e previsão dos efeitos provocados nos organismos pela exposição combinada a duas ou mais substâncias tóxicas é particularmente importante para a avaliação de risco ecológico. O estudo dos efeitos da poluição aquática nos organismos é habitualmente efectuado através da elaboração de ensaios laboratoriais com compostos simples, o que dificulta a avaliação e previsão dos efeitos ecológicos e ecotoxicológicos das potenciais misturas que ocorrem no ambiente aquático. Assim, nos últimos anos tem aumentado o interesse na avaliação ecotoxicológica de misturas complexas de compostos químicos. Nesse sentido, diferentes autores têm, por um lado desenvolvido métodos específicos de análise que permitam uma melhor interpretação e compreensão dos efeitos encontrados e, por outro lado, efectuado ensaios com misturas, em geral binárias, de várias substâncias químicas, utilizando sobretudo invertebrados aquáticos e terrestres (Altenburger *et al.*, 2000; Backaus *et al.*, 2000; Barata *et al.*, 2005, 2006, 2007; van Der Geest *et al.*, 2000; Jonker *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2008; Gomez-Eyles *et al.*, 2009; Loureiro, *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2009).

Dois modelos teóricos clássicos são habitualmente utilizados para descrever as relações entre os efeitos de compostos simples e das suas correspondentes misturas: o modelo de adição de concentração (AC) e o modelo de acção independente (AI) (Boedeker *et al.*, 1992; McCarty e Borgert, 2006). O modelo AC baseia-se no conceito de que os componentes da mistura estudada produzem a sua toxicidade através de um mecanismo comum, enquanto que o modelo AI pressupõe um modo de acção distinto para cada um dos componentes da mistura, eventualmente por interacção com diferentes locais alvo e/ou através

de vias ou reacções distintas relacionadas com a sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Ambos são utilizados como modelos de referência para prever a toxicidade esperada para a mistura em estudo, com base no conhecimento da toxicidade dos compostos individuais (Boedeker *et al.*, 1992; McCarty e Borgert, 2006). Vários estudos têm vindo a mostrar a sua utilidade para a previsão da toxicidade de misturas compostas por substâncias com modos de acção tanto semelhantes como distintos (Antenburger *et al.*, 2000; Backhaus *et al.*, 2000; Barata *et al.*, 2005, 2006, 2007). Contudo, estes modelos não entram em consideração com possíveis interacções entre as substâncias químicas, o que pode limitar a sua capacidade de previsão dos efeitos combinados (McCarty e Borgert, 2006). Estas podem incluir interacções químicas e físico-químicas com os constituintes do meio, interacções toxicocinéticas, com influência na absorção e distribuição dos compostos, interacções toxicodinâmicas, com influência no metabolismo e excreção dos compostos, ou ainda associações no receptor, célula ou tecido alvo (Van Gestel e Hensbergen, 1997). Estas interacções podem resultar em efeitos sinérgicos ou antagonísticos, ou ainda em efeitos dependentes do nível de concentração (NC) ou da razão entre os componentes da mistura (RC). Para lidar com esta questão, Jonker e colaboradores propuseram em 2005 três funções adicionais que podem ser utilizadas com os modelos clássicos de AC e AI e permitem estudar desvios sistemáticos a estes modelos devidos a possíveis interacções entre os componentes da mistura.

Este estudo teve por objectivo avaliar e prever a toxicidade de uma mistura binária de deltametrina e nitritos para *D. magna* assumindo o modelo de acção independente para estas duas substâncias. O método proposto por Jonker *et al.* (2005), *MixTox Models*, foi utilizado para identificar desvios sistemáticos (*i.e.*, sinergia/antagonismo, e desvios dependentes do nível de concentração ou da razão entre componentes) dos efeitos desta mistura ao modelo de acção independente.

III.2. Material e métodos

III.2.1. Organismos teste

Nos ensaios realizados neste trabalho foram utilizados juvenis de *D. magna* (clone A, *sensu* Baird *et al.*, 1989a) nascidos nas 3^a a 5^a ninhadas, com idade superior a 6h e inferior a 24h, provenientes das culturas laboratoriais mantidas de acordo com a metodologia descrita no capítulo II.2.1.

III.2.2. Plano experimental

O plano experimental adotado incluiu a avaliação simultânea de cada composto simples e um conjunto de 20 combinações diferentes de deltametrina e nitritos. Esta avaliação simultânea permite controlar para a variabilidade devida a diferenças entre ensaios, e aumentar a fiabilidade da análise dos resultados das combinações testadas. As combinações utilizadas foram planeadas de modo a caracterizar o melhor possível a superfície de concentração-resposta, tomando em consideração possíveis efeitos dependentes do nível de concentração e da razão entre os componentes da mistura, de acordo com o esquema apresentado na Figura 4. A elaboração deste plano baseou-se no conceito de unidade tóxica (UT). Este conceito adimensional é definido como a razão entre uma determinada concentração (C) de uma substância e a concentração necessária para provocar um efeito de 50% (CE50) no critério de toxicidade estudado (Jonker *et al.*, 2005): $UT=C/CE50$. Para o cálculo das concentrações a testar a partir das UT, utilizaram-se valores de CL50 às 48 horas, previamente determinados em ensaios padronizados de toxicidade aguda da deltametrina e dos nitritos, como concentrações de efeito a 50% dos tóxicos na mistura. As 20 concentrações nominais utilizadas no ensaio de mistura foram calculadas a partir das UT seguintes: 0.20 (0.100+0.100), 0.35 (0.150+0.200, 0.200+0.150), 0.50 (0.150+0.350, 0.250+0.250, 0.350+0.150), 0.75 (0.150+0.600, 0.250+0.500, 0.375+0.375, 0.500+0.250, 0.600+0.150), 1 (0.150+0.850, 0.250+0.750, 0.350+0.650, 0.500+0.500, 0.650+0.350, 0.750+0.250, 0.850+0.150), 1.5 (0.750+0.750) e 2,0 (1.00+1.00).

A análise dos dados obtidos é baseada num modelo de regressão, de acordo com o modelo teórico assumido, em que a variância para efeitos de

inferência estatística é calculada através dos desvios entre os dados observados e os valores previstos pelo modelo em questão. O número de réplicas a elaborar não é por isso essencial neste caso, pelo que se privilegiou a realização de um maior número de combinações diferentes, em detrimento do número de réplicas, de modo a obter uma caracterização mais fiável da superfície de resposta (Jonker *et al.*, 2005).

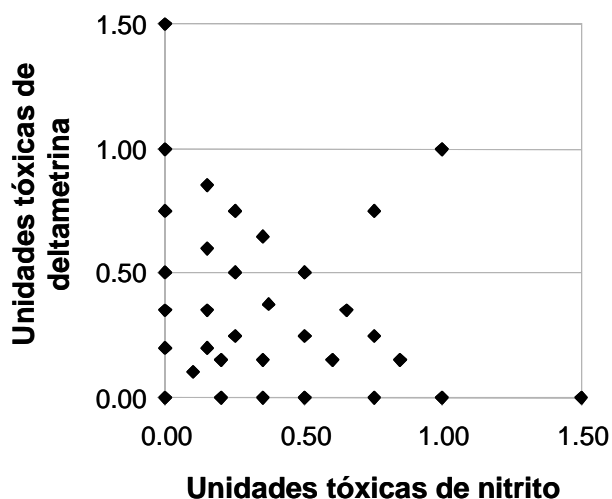


Figura 4 – Plano experimental adoptado no ensaio de toxicidade da mistura binária de deltametrina e nitrito, indicando as combinações de unidades tóxicas utilizadas.

III.2.3. Ensaio de toxicidade

Os ensaios padronizados de toxicidade aguda efectuados para determinação prévia dos valores de CL50 para o clone de *D. magna* utilizado, foram realizados de acordo com a metodologia anteriormente descrita no capítulo II.2.2.

Para o ensaio de mistura de deltametrina com nitritos utilizou-se uma metodologia de base idêntica. Especificamente, o ensaio foi elaborado em meio água dura ASTM (ASTM, 1980) e iniciado com juvenis nascidos nas 3^a a 5^a ninhadas, com idade superior a 6h e inferior a 24h. Durante o ensaio os organismos não foram alimentados. Por cada combinação de deltametrina e nitritos testada foram expostos um total de 10 animais distribuídos por 2 réplicas. Os animais foram expostos em recipientes de vidro de 200 mL de capacidade contendo cada um 50 mL de solução teste. O ensaio decorreu em condições de temperatura e fotoperíodo constantes de 20±1 °C e 16h luz: 8h

escuro, e teve a duração de 48 horas. O critério de efeito quantificado foi a morte avaliada através da imobilização durante 15 segundos dos juvenis quando expostos a um estímulo luminoso. Desta forma determinou-se às 24 e às 48 h quantos organismos se encontravam mortos, registrando-se em folha adequada ao efeito o número de sobreviventes por réplica e por combinação da mistura testada.

III.2.4. Soluções teste

Nos ensaios realizados utilizou-se o insecticida deltametrina e nitrito de sódio como fonte de nitritos. Estas substâncias eram de grau analítico e foram adquiridas à Sigma-Aldrich. Nos ensaios padronizados de toxicidade aguda testaram-se as seguintes séries de concentrações: 0.00, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 e 2.5 µg/L para a deltametrina e 0.00, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 e 200.00 mg/L para os nitritos. Dada a disparidade de valores encontrados na literatura, que variam entre 0.03 e 30 µg/L (Xiu *et al.*, 1989; Day e Maguire, 1990; Pesticide Ecotoxicity Database, 2000) as concentrações a testar no ensaio simples com deltametrina foram estabelecidas em função dos resultados obtidos num primeiro ensaio em que foram testadas as concentrações de 0.0025, 0.025, 0.25, 2.5 e 25µg/L. Em todos os ensaios realizados com deltametrina, incluindo o ensaio de mistura com nitritos, foi ainda preparado um grupo controlo com meio água dura ASTM e acetona, como solvente utilizado, na concentração mais elevada utilizada para preparar as soluções teste (< 1%).

No ensaio de mistura de deltametrina e nitritos, testaram-se concentrações de deltametrina entre 0.19 e 3.00 µg/L e concentrações de nitritos entre 3 e 100 mg/L. Todas as soluções teste foram preparadas por diluição das respectivas soluções reserva com meio água dura ASTM.

III.2.5. Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios padronizados de toxicidade aguda da deltametrina e dos nitritos para determinação dos valores de CL50 foram analisados de acordo com a metodologia descrita no capítulo II.2.4, através da análise Probit utilizando o método de Finney (1971) e o programa estatístico SPSS

para Windows v16.0. Os valores de Concentração de Efeito Não Observado (CENO) foram determinados como a concentração testada mais elevada que não provocou mortalidade superior a 10%, conforme as normas da OCDE para a percentagem de mortalidade aceitável nos organismos controlo (OCDE, 2004). A Concentração de Efeito Observado (CEO) foi determinada como a concentração testada mais baixa que provocou mortalidade superior a 10%.

No ensaio de mistura, a relação concentração-resposta para os compostos simples foi estudada através do ajuste aos dados obtidos de uma função log-logística: $y = \max/[1 + (C_i / CE50)^\beta]$, em que C_i representa a concentração do composto i , β representa o declive da função e \max a resposta obtida quando a concentração do composto i é zero. O ajuste foi efectuado por minimização da soma do quadrado dos desvios (SS) utilizando a função *Solver* (algoritmo *Newton*) no programa Microsoft Excel (Redmond, WA, USA) conforme Jonker *et al.* (2005). A toxicidade da mistura de deltametrina e nitritos foi estudada utilizando o modelo AI. Para o efeito seguiu-se um procedimento idêntico ao utilizado para os compostos simples mas ajustando a função simultaneamente aos dados obtidos para os compostos simples e a mistura, utilizando os parâmetros obtidos no passo anterior como ponto de partida e minimizando da mesma forma a soma do quadrado dos desvios. Para as três funções de estudo de desvios sinérgicos/antagónicas, dependentes do nível de concentração ou da razão entre compostos (Jonker *et al.*, 2005), foram sucessivamente adicionados ao modelo AI dois parâmetros (a e b_i) para verificar se este modelo hierárquico melhorava o ajuste aos dados. A interpretação destes parâmetros foi feita de acordo com o método proposto por Jonker *et al.* (2005). A diferença entre valores de SS foi utilizada para testar a significância estatística de possíveis melhoramentos no ajuste devidos aos parâmetros introduzidos, relativamente ao modelo AI, através de um teste de razão de verosimilhanças. O número de graus de liberdade ($g.l.$) é igual à diferença entre o número de parâmetros nos dois modelos comparados, efectuando para o efeito testes de qui-quadrado. Todas as análises descritas foram efectuadas utilizando o modelo MixTox implementado na folha de cálculo "MixToxModules.xls" (disponível em www.ceh.ac.uk/sections/er/documents/MixToxModules.xls), conforme o método descrito por Jonker *et al.* (2005).

III.3. Resultados

Ensaio de toxicidade aguda

Para os ensaios padronizados de toxicidade aguda da deltametrina e dos nitritos, a concentração de oxigénio dissolvido medida nos recipientes teste ao longo do ensaio foi sempre igual ou superior a 70% (Tabelas 6 e 7). A variação de pH nos recipientes teste não ultrapassou 1.5 unidades em nenhum dos casos. A temperatura registada sofreu uma variação inferior a 1 unidade.

De acordo com os resultados apresentados nas Figura 5 e 6, não se observou mortalidade nos recipientes controlo nem nos recipientes controlo com solvente em nenhum dos ensaios realizados. A mortalidade observada no ensaio com deltametrina variou entre um mínimo de 5% para a concentração de 0.16 µg/L e um máximo de 70% para a concentração de 2.50 µg/L. Para o ensaio com nitritos a mortalidade registada variou entre um mínimo de 27 % para a concentração de 6.25 mg/L e um máximo de 100 % para as duas concentrações mais elevadas que foram testadas. Na Tabela 8 apresentam-se os valores de CENO, CEO, CL10, CL50 e CL90 determinados às 48 horas a partir dos resultados obtidos nestes ensaios.

Os valores obtidos nestes ensaios foram utilizados para o cálculo das concentrações a testar no ensaio de mistura destas duas substâncias a partir das unidades tóxicas escolhidas.

Ensaio de mistura

No teste de mistura não se verificou mortalidade nem no grupo controlo, nem no grupo exposto ao solvente da deltametrina após 48 horas de exposição, à semelhança do que já se tinha verificado para os ensaios simples. Os resultados dos ensaios simples de deltametrina e nitritos realizados em simultâneo com o ensaio de mistura foram primeiro analisados utilizando a função log-logística (Tabela 9 e Figura 7). A função log-logística ajustou-se bem aos dados obtidos conforme indicado pelos valores elevados de R^2 (0.89 para a deltametrina e superior a 0.99 para os nitritos, Tabela 9), confirmando a sua utilidade para estudar os efeitos provocados pela exposição a estas substâncias. Conforme

esperado verifica-se uma diminuição da sobrevivência com o aumento da concentração, sendo a deltametrina mais tóxica que o íão nitrito.

Tabela 6 – Valores de temperatura (T), pH, concentração de oxigénio dissolvido (OD) e condutividade medidos durante o ensaio de toxicidade aguda da deltametrina para *D. magna*. Os valores apresentados correspondem à média e respectivos erros padrão das leituras efectuadas para cada concentração.

Parâmetros	Concentração (µg/L)						
	C	C+S	0.16	0.31	0.63	1.25	2.50
T (°C)	20.7±0.13	20.8±0.13	21.4±0.38	21.3±0.39	21.2±0.37	21.2±0.32	20.9±0.21
pH	7.9±0.03	7.9±0.03	8.2±0.06	8.1±0.05	8.1±0.04	8.1±0.08	8.0±0.05
OD (%)	73.7±1.42	71.8±2.30	76.3±0.77	76.8±1.16	76.9±1.27	75.7±3.06	75.9±1.83
Condutividade (µS/cm)	643±8.0	644±5.0	642±3.0	645±3.0	647±3.0	642±2.0	646±3.0

Tabela 7 – Valores de temperatura (T), pH, concentração de oxigénio dissolvido (OD) e condutividade medidos durante o ensaio de toxicidade aguda do nitrito para *D. magna*. Os valores apresentados correspondem à média e respectivos erros padrão das leituras efectuadas para cada concentração.

Parâmetros	Concentração (mg/L)						
	C	6.25	12.50	25.00	50.00	100.00	200.00
T (°C)	19.7±0.42	20.4±0.42	20.4±0.41	20.4±0.44	20.4±0.44	20.2±0.40	20.1±0.37
pH	8.1±0.09	8.3±0.23	8.4±0.34	8.4±0.31	7.7±0.37	8.2±0.06	8.2±0.09
O2 (mg/L)	87.7±1.04	92.0±0.86	90.7±0.86	90.5±0.93	90.5±1.88	90.5±1.23	89.7±1.04
Condutividade (µS/cm)	619±13.0	647±7.0	723±7.0	724±9.0	664±10.0	637±11.0	622±8.0

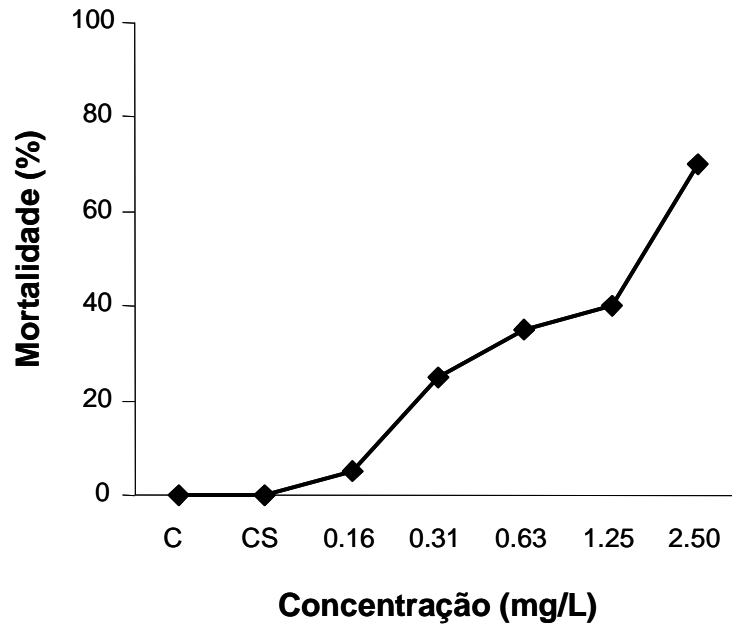


Figura 5 – Curva de toxicidade aguda da deltametrina para *Daphnia magna*, obtida após 48 horas de exposição.

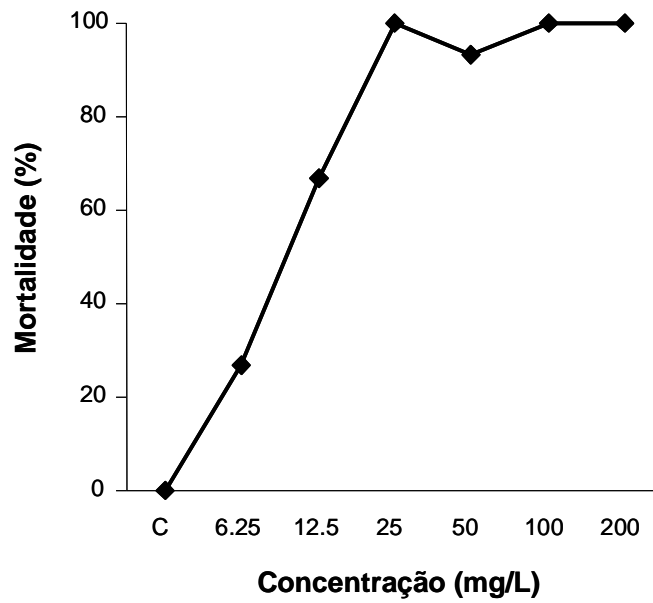


Figura 6 – Curva de toxicidade aguda dos nitritos para *Daphnia magna*, obtida após 48 horas de exposição.

Tabela 8 – Parâmetros de toxicidade obtidos após 48 horas de exposição para os ensaios de toxicidade aguda da deltametrina e do ião nitrito para *D. magna*. CENO, concentração de efeito não observado; CEO, concentração de efeito observado; Declive, declive da regressão linear estimada pela análise Probit; CL10, CL50 e CL90, concentrações letais a 10 %, 50 % e 90 %, respectivamente; IC95%, intervalo de confiança a 95%. Os valores de concentração são apresentados em µg/L para a deltametrina e em mg/L para o nitrito.

Substância teste	CENO	CEO	Declive (IC95%)	CL10 (IC95%)	CL50 (IC95%)	CL90 (IC95%)
Deltametrina	0.16	0.31	1.48 (0.79-2.16)	0.17 (0.04-0.31)	1.29 (0.84-2.65)	9.51 (3.95-93.65)
Nitrito	<6.25	<6.25	2.98 (1.61-4.36)	3.4 (1.03-5.54)	9.15 (5.66-12.47)	24.63 (17.46-49.95)

Tabela 9 – Parâmetros da curva de concentração-resposta e valores de EC50 obtidos para os efeitos simples da deltametrina (µg/L) e do nitrito (mg/L) na sobrevivência de *D. magna*, medidos em simultâneo com o ensaio de mistura efectuado.

Substância testada	Parâmetro			R ²
	Max	β	EC50	
Deltametrina	104	1.14	0.55	0.891
Nitrito	101	2.07	15.72	0.998

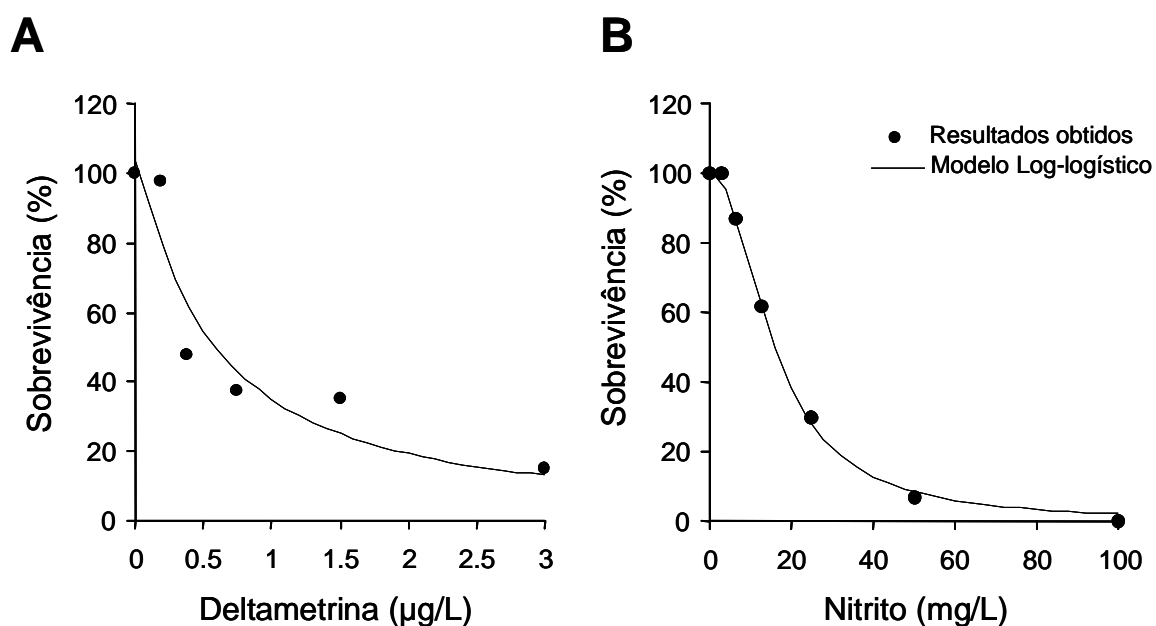


Figura 7 – Efeitos das exposições simples à deltametrina (A) e ao nitrito (B) efectuadas em simultâneo com o ensaio de mistura (valores médios).

Relativamente aos valores de CL50 determinados nos ensaios de toxicidade aguda para elaboração do planeamento experimental verifica-se que o

valor encontrado para a deltametrina é cerca de 2 vezes inferior ao previamente encontrado, enquanto que o obtido para os nitritos é cerca de 1.6 vezes superior. Em ensaios para a avaliação da toxicidade de misturas binárias de substâncias químicas para *C. elegans*, outros autores encontraram diferenças, entre os ensaios para determinação de EC50s e as avaliações simples durante os testes de mistura, por vezes superiores a uma ordem de grandeza, embora na maioria dos casos inferiores a duas vezes (Martin *et al.*, 2009). Embora estatisticamente significativas estas diferenças são baixas. Contudo o facto de se verificarem reforça a necessidade de efectuar a avaliação dos compostos simples em simultâneo com a mistura, dado a sua importância para a análise dos efeitos das misturas.

Para o efeito da mistura, o ajuste do modelo de referência aos dados de sobrevivência permitiu explicar 80 % da variabilidade observada ($SS=8088$, Tabela 10). Contudo, verificou-se que os modelos com maior número de parâmetros apresentavam um melhor ajuste aos dados observados (Tabela 10, Figura 8).

A inclusão do parâmetro a no modelo AI para descrever a interacção de sinergismo/antagonismo diminuiu significativamente o valor de SS ($\chi^2=6.83$, $p(\chi^2)<0.01$, Tabela 10). O parâmetro a apresentou um valor negativo (-5.06) indicando sinergismo entre os componentes da mistura. A inclusão dos parâmetros a e b_{NC} para estudo de desvios dependentes do nível de concentração originou um valor de SS (6531), significativamente inferior ao do modelo AI, mas semelhante ao obtido pelo estudo de desvios de sinergismo/antagonismo (Tabela 10).

A inclusão dos parâmetros a e $b_{deltametrina}$ para estudo de desvios dependentes da razão entre os componentes da mistura resultou numa maior diminuição do valor de SS (6005), em comparação com os restantes modelos. Efectivamente observou-se uma melhoria significativa do ajuste ($\chi^2=9.53$, $p(\chi^2)<0.01$) aos dados, relativamente ao modelo de referência, explicando este tipo de interacção 89% da variância observada (Tabela 10 e Figura 8). O modelo aceite foi por isso o de desvios dependentes da razão entre os componentes da mistura. Para este, o valor obtido para o parâmetro $b_{deltametrina}$ foi negativo (-19.00), indicando um aumento de toxicidade quando o efeito da mistura era devido sobretudo à deltametrina, enquanto que parâmetro a foi positivo (5.4), indicando uma diminuição da toxicidade quando o efeito da mistura era causado sobretudo pelos nitritos. A alteração de sinergismo para antagonismo ocorreu quando $UT_{nitritos} = 2.5UT_{deltametrina}$.

Tabela 10 – Resultados da análise do efeito da deltametrina e dos nitritos na sobrevivência de *D. magna*. Max , resposta para os grupos controlo; β , declive da curva individual de concentração-resposta; $EC50$ (em $\mu\text{g/L}$ para a deltametrina e em mg/L para os nitritos), concentração efectiva a 50%; a , b_{del} e b_{NC} , parâmetros das funções de desvio ao modelo de referência; SS , soma do quadrado dos desvios; χ^2 , estatística teste; $g.l.$, graus de liberdade; $p(\chi^2)$, significância do teste de razão de verosimilhanças. S/A, sinergismo/antagonismo; NC, desvios ao modelo de referência dependentes do nível de concentração; DR, desvios ao modelo de referência dependentes da razão entre componentes da mistura; n.a., o parâmetro não se aplica ao modelo em questão.

Parâmetros	Acção Independente			
	Referência	S/A	NC	DR
max	111.5	98.15	98.20	98.00
$\beta_{deltametrina}$	2.88	8.33	8.41	13.40
$\beta_{nitritos}$	1.35	2.10	2.12	2.54
$EC50_{deltametrina}$	0.30	0.36	0.35	0.37
$EC50_{nitritos}$	11.09	16.26	16.24	16.58
a	n.a.	-5.06	-5.26	5.43
$b_{deltametrina}$	n.a.	n.a.	n.a.	-19.00
b_{NC}	n.a.	n.a.	0.17	n.a.
SS	8088	6534	6531	6005
χ^2	n.a.	6.83	6.84	9.53
$g.l.$	n.a.	1	2	2
$p(\chi^2)$	n.a.	0.0090	0.0327	0.01

III.4. Discussão

Os valores de concentração letal mediana às 48 horas obtidos para a deltametrina (na ordem das ppb) confirmam a toxicidade elevada desta substância para *D. magna*, consistente com o facto de esta ser uma espécie de artropodes filogeneticamente relacionada com os organismos alvo para os quais este insecticida foi desenvolvido.

Num estudo muito recente sobre o comportamento de evitamento de *D. magna* quando exposta a substâncias tóxicas, Ren *et al.* (2009) obtiveram para a deltametrina um valor de CL50 às 48 horas de 0.45 $\mu\text{g/L}$, próximo ao encontrado neste trabalho, tanto nos ensaios padronizados de toxicidade aguda (1.29 $\mu\text{g/L}$) como nas avaliações simples efectuadas com o ensaio de mistura (0.55 $\mu\text{g/L}$). Por seu lado, a Pesticide Ecotoxicity Database indica uma CL50 às 48 horas de 0.11 $\mu\text{g/L}$ (USEPA, 2000). Estes valores são contudo superiores ao de 0.03 $\mu\text{g/L}$ obtido por Xiu *et al.* (1989). Em contrapartida Day e Maguire (1990) encontraram valores de CL50 compreendidos entre 30 e 90 $\mu\text{g/L}$, enquanto que num outro estudo

Eybe e colaboradores (2009), observaram 76 % de mortalidade após uma exposição de 48 horas a uma concentração de 200 µg/L de deltametrina.

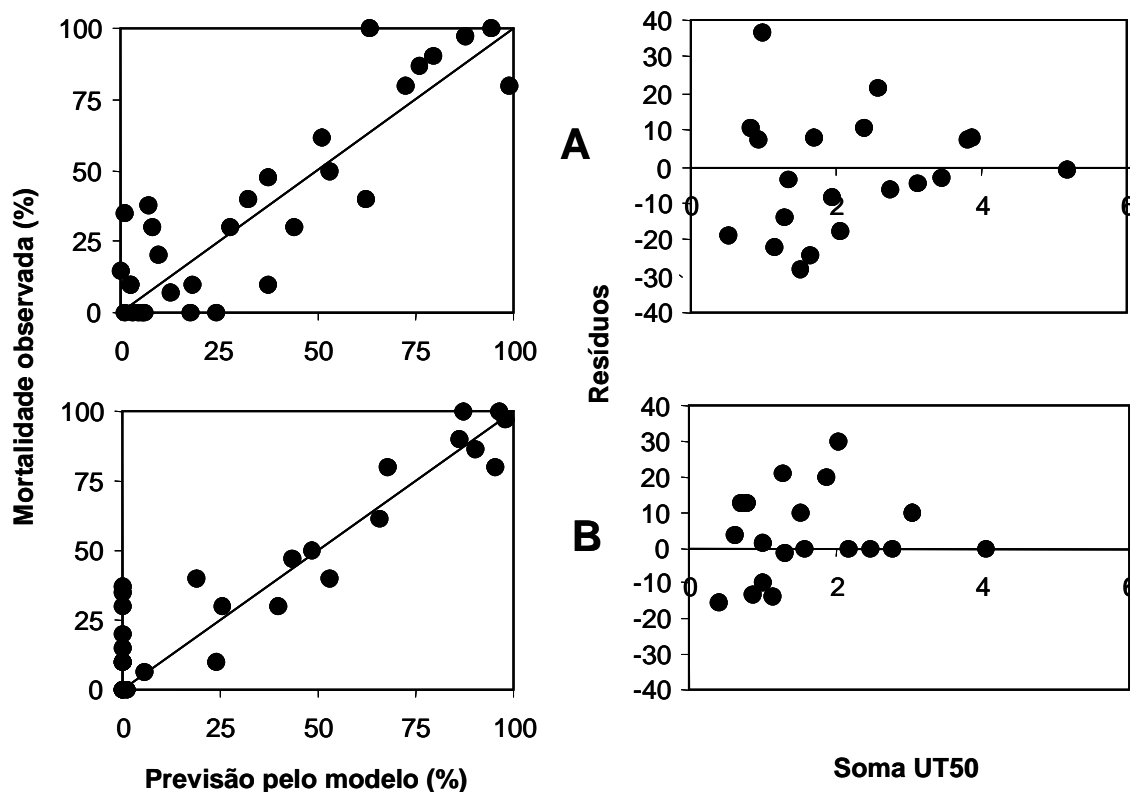


Figura 8 – Efeito da mistura binária de deltametrina e nitrito na sobrevivência de *D. magna*. À esquerda apresenta-se a relação entre os dados observados e os valores previstos pelo modelo de acção independente (A) e pelo modelo de desvio ao AI dependente da razão entre componentes (C), utilizando o modelo MixTox. A linha diagonal representa a concordância máxima entre dados observados e previstos pelos modelos ajustados. À direita apresentam-se os resíduos dos dados obtidos para a mistura após ajuste do modelo respectivo.

Os valores de LC50, às 48 horas, dos nitritos para *D. magna*, obtidos neste trabalho foram de 9.15 mg/L para os ensaios padronizados de toxicidade aguda e de 15.72 mg/L na avaliação simples efectuada em simultâneo com o ensaio de mistura. Outros autores encontraram valores ligeiramente superiores quer para *D. magna*, de 30.0 mg/L (Ewell *et al.*, 1986) e 27.6 mg/L (Adamsson e Dave, 1996), quer para *Ceriodaphnia dubia* (46 mg/L; Dave e Nilsson, 2005).

Relativamente ao ensaio de mistura, os resultados obtidos sugerem que esta combinação causa efeitos tóxicos mais graves quando a deltametrina é o composto dominante que mudam para efeitos menos graves quando os nitritos são dominantes. Um desvio ao AI dependente da razão entre componentes foi também observado por Ferreira *et al.* (2008) na avaliação da toxicidade de uma mistura de cádmio e carbendazim para a sobrevivência de *D. magna*.

À semelhança do trabalho de Ferreira *et al.* (2008) e dos trabalhos de outros autores sobre a avaliação da toxicidade de misturas binárias para invertebrados terrestres, verifica-se aqui também que o modelo AI não foi o que permitiu uma melhor caracterização da toxicidade da mistura de deltametrina e nitritos. Por exemplo, numa avaliação da toxicidade de 10 combinações binárias de substâncias químicas com modos de acção distintos para a reprodução de *C. elegans*, Martin *et al.* (2009) verificaram que 6 dessas misturas foram adequadamente descritas pelo modelo AI, enquanto que em três delas se observaram desvios ao modelo de referência. De facto estes autores encontraram efeitos sinérgicos para as misturas de níquel e procloraz, e diurão e cádmio, e efeitos antagonísticos para a mistura de clorpirifos e cádmio (Martin *et al.*, 2009). Uma situação idêntica tinha já sido detectada por Jonker e colaboradores (2005). Estes autores demonstraram a utilidade dos modelos com maior número de parâmetros, em relação à parcimónia do modelo AI, para avaliação da ecotoxicidade de 4 misturas binárias para três espécies diferentes de invertebrados terrestres (*F. candida*, *E. andrei*, *T. castaneum*). Por outro lado, tanto Lock e Janssen (2002), num trabalho sobre reprodução de *E. albidus*, como Altenburger *et al.* (2000), em relação à espécie de alga unicelular *Scenedesmus vacuolatus*, tinham já observado que nas situações em que ocorrem desvios sinérgicos o AI parece subestimar da toxicidade de misturas binárias.

CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A contaminação dos ecossistemas aquáticos por pesticidas tem vindo sucessivamente a aumentar desde há várias décadas, em consequência da intensificação continuada das actividades humanas capazes de produzir resíduos destes compostos. De entre os pesticidas detectados no meio aquático, os resíduos de herbicidas e insecticidas são os mais frequentemente encontrados em águas naturais superficiais (Liu *et al.*, 2009). Um dos herbicidas de mais ampla utilização é a simazina, cujos resíduos têm sido detectados também em águas portuguesas e espanholas (Azevedo *et al.*, 2000; Cerejeira *et al.*, 2000; Tauler *et al.*, 2001; Oropesa *et al.*, 2009). A contaminação de origem antropogénica tem ainda contribuído, directa ou indirectamente, para a alteração de factores abióticos da água com elevada influência na fisiologia e no metabolismo dos organismos aquáticos. Dois destes factores com particular relevância para os seres vivos são a temperatura da água e a concentração de nitritos. O aumento da temperatura da água é especialmente importante para organismos ectotérmicos, por influenciar vários processos fisiológicos essenciais e poder influenciar a toxicidade de várias substâncias químicas (Heugens *et al.*, 2003). A conjugação destes aspectos com as alterações climáticas em curso no planeta, levanta questões relacionadas com o efeito do aumento de temperatura na toxicidade de pesticidas. Os ensaios padronizados com o microcrustáceo *D. magna* são bastante úteis e dos mais utilizados em estudos ecotoxicológicos, sendo também necessários para a avaliação da ecotoxicidade de novos compostos químicos recomendada por organizações internacionais como a EPA e a OCDE. Os resultados do estudo dos efeitos ecotoxicológicos da simazina para *D. magna* a 20 e a 25 °C parecem indicar que a temperatura aumenta a toxicidade aguda desta substância, conforme sugerido pelos valores de CL50, às 48 horas, respectivamente de 24.9 mg/L, IC95%= (13.5-164.4), e 12.3 mg/L, IC95%= (8.9-22.2). Embora o aumento da temperatura pareça provocar uma diminuição para metade da CL50, os valores obtidos em ambos os casos sugerem uma toxicidade moderada da simazina para *D. magna*. Estes valores são ainda bastante superiores às concentrações de simazina detectadas, por exemplo, em amostras de águas naturais de algumas áreas portuguesas (0.3-2.3 µg/L; Azevedo *et al.*, 2000; Cerejeira *et al.*, 2000; Tauler *et al.*, 2001) e espanholas (Oropesa *et al.*, 2009). No entanto, concentrações bastante mais elevadas (0.2 e 232 ppm) foram por exemplo detectadas na década de 1980, em lagos de alguns

estados da América do Norte, na sequência da aplicação de simazina ou Princep 80W nestas águas para controlo de crescimento de algas (USEPA, 2007). Para além disso, considerando que a simazina é um composto persistente no ambiente aquático (Mauck *et al.*, 1976) a interacção com o aumento de temperatura pode representar um risco aumentado para os animais aquáticos. Sobretudo, dada a escassa informação disponível sobre os efeitos sub-letais da simazina para invertebrados de ecossistemas dulciaquícolas, seria importante estudar o efeito da temperatura na toxicidade crónica deste composto para *D. magna*, utilizando o crescimento e a reprodução como critérios de efeito.

O aumento da concentração de nitritos nos ecossistemas aquáticos decorrente do contínuo aumento da poluição antropogénica torna necessária a avaliação do seu efeito combinado com outros xenobióticos comuns nestes ecossistemas, como é o caso da deltametrina. Sabe-se que a deltametrina actua como bloqueador dos canais de sódio das membranas neuronais, e inibidor do ácido gama-aminobutírico (GABA), originando hiperexcitabilidade, perda de coordenação, convulsões e espasmos musculares, podendo levar à morte dependendo da concentração de exposição (Olson, 2006). Os nitritos exercem os seus efeitos tóxicos principalmente através da oxidação dos pigmentos transportadores de oxigénio para formas incapazes de transportar esta molécula eficazmente, causando hipoxia e morte (Jensen, 2003; Carmago e Alonso, 2006). Esta informação indica que estas duas substâncias apresentam um modo de acção distinto pelo que o estudo dos seus efeitos tóxicos combinados que foi realizado neste trabalho se baseou no modelo de referência de acção independente. Considerando que interacções entre substâncias químicas em mistura podem ocorrer ao nível da sua absorção e distribuição nos organismos, e do seu metabolismo e excreção, alterando os efeitos induzidos, relativamente à sua toxicidade individual, integrou-se no modelo de referência a análise de possíveis desvios devidos a efeitos sinérgicos/ antagonísticos, ou dependentes do nível de concentração ou da razão entre os componentes da mistura, conforme o método proposto por Jonker *et al.* (2005). A análise dos resultados obtidos sugere um efeito dependente da razão entre componentes da mistura na sobrevivência de *D. magna*, em que se prevê um aumento de toxicidade quando a deltametrina é dominante na mistura, e uma diminuição da toxicidade quando os nitritos são o componente principal. Para a utilização destes modelos, foi determinante a caracterização prévia das relações concentração-resposta para os compostos simples, que permitiram a elaboração de um planeamento

experimental adequado, e a avaliação simples de cada composto em simultâneo com as diferentes combinações estudadas, como sugerido por outros autores (Jonker *et al.*, 2005; Gomez-Eyles *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2009). O modelo AI, como já verificado para outras misturas binárias em que um pesticida foi utilizado como um dos componentes, não foi também neste caso o que melhor permitiu descrever os resultados obtidos e prever a toxicidade da mistura. Neste sentido, os modelos desenvolvidos por Jonker *et al.* (2005) foram particularmente úteis para a avaliação e previsão da toxicidade da mistura de deltametrina e nitritos para *D. magna*. Por último, a avaliação de efeitos tóxicos desta mesma mistura para outras espécies aquáticas, bem como de misturas binárias de outros pesticidas com nitritos será útil quer para a avaliação e previsão de efeitos tóxicos quer para a melhor compreensão da interacção com este factor abiótico e dos mecanismos de toxicidade envolvidos.

CAPÍTULO V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamsson, M., Dave, G., 1996. Toxicity of human urine, its main nitrogen excretory and degradation products to *Daphnia magna*. *Environmental Research Forum*, **5-6**:137-144.

Altenburger, R., Backaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, H. 2000. Predicting of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**:2341-2347.

Altindag, A., Ergonul, M.B., Yigit, S., BayKan, O. 2008. The acute toxicity of lead nitrate on *Daphnia magna* Straus. *African Journal of Biotechnology*, **23** (7).4298-4300.

Arauco, L.R.R., Cruz, G., Neto, J.G.M. 2005. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do Triclorfon para três espécies de *Daphnia*. *Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente*, **15**:55 - 64.

ASTM. 1980. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report E-790-80. *American Society for the Testing and Materials*. Philadelphia.

Azevedo, D.A., Lacorte, S., Vinhas, T., Viana, P., Barceló, D., 2000. Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **879**:13-26

Backaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, H. 2000. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**:2348-2356.

Baird, D.J., Barber, I., Bradley, M., Calow, P., Soares, A.M.V.M. 1989a. The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiology*, **188/189**: 403-406.

Baird, D. J., Soares, A.M.V.M., Girling, A., Barber, I., Bradley, M.C., Calow, P. 1989b. The long-term maintenance of *Daphnia magna* for use in ecotoxicity tests: Problems and prospects. *In: Lokke, H., Tyle, H., Bro-Rasmussen (Eds). Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology, 17- 19 October 1988, Lyngby, Denmark, p. 144-148.*

Barata C, Baird DJ, Soares AM, Guilhermino L. 2001. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49**:155-63.

Barata,C., Markich,S., Baird, D.J., Taylor, G., Soares, A.M.V.M. 2002. Genetic variability in sublethal tolerance to mixtures of cadmium and zinc in clones of *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, **60**: 85–99.

Barata, C., Calbet, A., Saiz, E., Ortiz, L., Bayona, J.M. 2005. Predicting single and mixture toxicity of petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons to the copepod *Oithona davisae*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**:2992-2999.

Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., Riva, M.C. 2006. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquatic Toxicology*, **78**:1-14.

Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Agra, A.R., Soares, A.M.V.M. 2007. Life-history responses of *Daphnia magna* Straus to binary mixtures of toxic substances: pharmacological versus ecotoxicological modes of action. *Aquatic Toxicology*, **84**:439-449.

Batista, S., Silva, E., Galhardo, S., Viana, P., Cerejeira, M.J. 2002. Evaluation of pesticide contamination of ground water in two agricultural areas of Portugal. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, **82**:601-609.

Beatrici, A.C., Arenzon, A., Coimbra, N.J., Raya-Coimbra, N.J., Raya-Rodrigues, M., T. 2006. Fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* submetidas a diferentes cultivos. *Jornal Brasileiro Sociedade Ecotoxicologica*, **2** (1): 123-126.

Boedeker, W., Altenburger, R, Faust, M., Grimme, H. 1992. Synopsis of concepts and models for quantitative analysis of combination effects: from biometrics to ecotoxicology. *Archives of Complex Environmental Studies*, **4**:45-53.

Camargo, J.A., Alonso, A. 2006. Ecological and ecotoxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*, **32**:1255-1267.

Cerejeira, M.J., Silva, E., Batista, S., Trancoso, A., Centeno, M.S.L., Silva-Fernandes, A. 2000. Simazine, Metribuzine and Nitrates in ground water of agricultural áreas of Portugal. *Toxicological and Environmental Chemistry*, **75**:245-253.

Cooney, J.D. 1995. Freshwater tests. In: Rand, G.M. (ed) *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment*. CRC, New York, pp. 71-102.

Dave, G., Nilsson, E. 2005. Increased reproductive toxicity of landfill leachate after degradation was caused by nitrite. *Aquatic Toxicology*, **73**:11-30.

Day, K.E., Maguire, R.J. 1990. Acute toxicity of isomers of the pyrethroid insecticide deltamethrin and its major degradation products to *D. magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**:1297-1300.

De-Lamonica-Freire, M.E., Dores, E.,F. 2001. Contaminação do Ambiente aquático por pesticidas, estudo do caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso – Análise preliminar. *Química Nova*, **1** (24): 27-36.

Diamantino, T.C., Guilhermino, L., Almeida, E., Soares, A.M.V.M. 2000. Toxicity of Sodium Molybdate and Sodium Dichromate to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **45**:253-259.

Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L. 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere*, **45**: 553-560.

Dias, A.M.P., Brentano, D.M., Carvalho-Pinto, C.R.S., Matias, W.G. 2006. Avaliação da toxicidade aguda de fluidos de corte utilizados em processos de usinagem usando como organismos teste *Poecilia reticulata* e *Daphnia magna*. *Biotemas*, **19** (3): 7-13.

Ewell, W.S., Gorsuch, J.W., Kringle, R.O., Robillard, K.A., Spiegel, R.C. 1986. Simultaneous evaluation of the acute effects of chemicals on seven aquatic species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **5**:831-840.

Eybe, T., Bohn, T., Audinot, J., N., Udelhoven, T., Cauchie, H.M., Migeon, H.N., Hoffmann, L. 2009. Uptake visualization of deltamethrin by NanoSIMS and acute toxicity to the water flea *Daphnia magna* *Chemosphere*, *In press*.

Fisher, S.W., Wadleigh, R.W. 1985. Effects of temperature on the acute toxicity and uptake of lindane by *Chironomus riparius* (Meigen) (Diptera: Chironomidae). *Journal of Economic Entomology*, **78**: 1222-1226.

Ferreira, A.L.G., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M. 2008. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **89**:28-39.

Florh, L., Brentano, D.M., Carvalho-Pinto, C.R.S., Matias, W.G. 2005. Classificação de resíduos sólidos industriais com base em testes ecotoxicológicos utilizando *Daphnia magna*: uma alternativa. *Biotemas*, **18** (2): 7-18.

Gomez-Eyles, J.L., Svendsen, C., Lister, L., Martin, H., Hodson, M.E., Spurgeon, D.J. 2009. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**:71-79.

Guilhermino, L. 1996. Modelos e sistemas de avaliação da toxicidade de substâncias químicas. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra. 197 pp.

Guilhermino, L., Lopes, M.C.; Carvalho, P.A., Soares, A.M.V.M. 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **4** (32): 721-738.

Heugens, E.H.W., Hendriks, A.A.J., Dekker, T., Van Straalen, N.M., Admiraal, W. 2001. A Review of the Effects of Multiple Stressors on Aquatic Organisms and Analysis of Uncertainty Factors for Use in Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, **31**(3):247-284.

HSDB. 2008. Simazine CASRN 122-34-9; Hazardous Substances Database Bank 1765. Hazardous Substances Data Bank. US National Library of Medicine, <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~ZTFX4r:1>.

Consultado em Novembro de 2008.

Jensen, F.B. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **135**:9-24.

Jo, H-J., Jung, J. 2008. Quantification of differentially expressed genes in *Daphnia magna* exposed to rubber wastewater. *Chemosphere*, **73**:261-266.

Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E. 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**:2701-2713.

Kim, K.R., Son, E.W., Rhee, D.K., Pyo, S. 2002. The immunomodulatory effects of the herbicide simazine on murine macrophage functions *in vitro*. *Toxicology in vitro*, **16**:517-523.

Klaasen, C., Watkin III, J. 2001. Toxicologia, a Ciência Básica dos tóxicos, 5ª Edição, McGraw- Hill.

Köprücü, K., Seker E. 2008. Acute toxicity of deltamethrin for freshwater mussel, *Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **80**:1-4.

Laitano, K.D.S., Matias, W.G. 2006. Testes de toxicidade com *Daphnia magna* : Uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. *Jornal Brasileiro Sociedade Ecotoxicologica*, **1** (1): 43-47.

Leão, R.M. 2000. A floresta e o homem. Edição de EdUSP.

Lewis Jr., W.M., Morris, D.P 1986. Toxicity of nitrite to fish: A review. *Transactions of the American Fisheries Society*, **115**:183-195.

Li, Q., Qian, Y., Yu, Y., Wub, G., Sui, Z., Wang, H. 2009. Actions of sodium nitrite on long period fiber grating with self-assembled polyelectrolyte films. *Optics Communications*, **282**: 2446-2450.

Liu, S-S., Song, X-Q., Liu, H-L., Zhang, Y-H., Zhang, J. 2009. Combined photobacterium toxicity of herbicide mixtures containing one insecticide. *Environment International*, **34**:773-781.

Loureiro, S., Amorim, M.J.B., Campos, B., Rodrigues, S.M.G., Soares, A.M.V.M. 2009. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. *Environmental Pollution*, **157**:625-636.

Martin, H.L., Svendsen, C., Lister, L.J., Gomez-Eyles, J.L., Spurgeon, D.J. 2009. Measurement and modeling of the toxicity of binary mixtures in the nematode *Caenorhabditis elegans* - a test of independent action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **28**:97-104.

Mauck, W.L., Mayer, F.L., Holz, D.D. 1976. Simazine residue dynamic in small ponds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **16**:1-8.

McCarty, L.S., Borgert, C.J. 2006. Review of the toxicity of chemical mixtures: theory, policy, and regulatory practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **45**:119-143.

Meeker, J.D., Barr, D.B., Hauser, R. 2009. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. *Reproductive Toxicology*, **27**:155-160.

Mendes, B., J.F. Santos; 2004. Qualidade da água para consumo humano, Lisboa, Lidel- edições técnicas.

Munn MD, Gilliom RJ, Moran PW, Nowell LH. 2006. Pesticide toxicity index for freshwater aquatic organisms, 2nd Edition: *U.S. Geological Survey Scientific Investigations*, Report 2006-5148, 81 p.

Nakagome, F.K., Noldin, J.A., Resgalla Jr., C. 2006. Toxicidade aguda e análise de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. *Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente*, **16**:93 -100.

OCDE. 2004. Guideline for testing the toxicity of chemicals n° 202. Daphnia. Acute immobilisation and reproduction test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Olson, K. 2006. Poisoning And Drug Overdose. 5th Ed. McGraw-Hill. 736 pp.

Oropesa, A.L., García-Cambero, J.P., Soler, F. 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **27**:30-38.

Ottoni, A. 1999. A importância da preservação dos mananciais de água para a saúde e sobrevivência do ser humano. *20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*:3731 - 3777.

Palma, P., Palma, V.L., Matos, C., Fernandes, R.M., Bohn, A., Soares, A.M.V.M., Barbosa, I.R. 2009. Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **74**: 676–681.

Patro, N., Shrivastava, M., Tripathi, S., Patro, I., K. 2009. S100 β upregulation: A possible mechanism of deltamethrin toxicity and motor coordination deficits. *Neurotoxicology and Teratology*, **31**:169–176.

Peters, R. H., De Bernardi, R. (Eds.). 1987. *Memorie Dell'Istituto Italiano di Idrobiologia Dott. Marco de Marchi, Volume 45, Daphnia*. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto Italiano di Idrobiologia, Verbania, Pallanza.

Ren, Z., Li, Z., Ma, M., Wang, Z., Fu, R. 2009. Behavioral responses of *Daphnia magna* to stresses of chemicals with different toxic characteristics. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **82**:310–316.

Salati, E., Santos, A., Klabin, I., 2006. Temas ambientais relevantes. *Estudos Avançados*, **56** (20):107-127.

Sener Ural, M., Saglam, N. 2005. A study on the acute toxicity of pyrethroid deltamethrin on the fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Pesticide Biochemistry and Physics*, **83**:124–131.

Strandberg, M.T., Scott-Fordsmand, J.J. 2002. Field effects of simazine at lower trophic levels-a review. *The Science of the Total Environment*, **296**:117-137.

Tauler R., Azevedo, D.D.A., Lacorte, S., Céspedes, R., Viana, P., Barceló, D. 2001. Organic Pollutants in Surface Waters from Portugal Using Chemometric Interpretation. *Environmental Technology*, **22**:1043-1054.

USEPA. 2000. Pesticide Ecotoxicity Database. Office of Pesticide Programs. Environmental Fate and Effects Division, USEPA, Washington, D.C.

USEPA. 2007. Simazine. Appendix D: Simazine aquatic incidents. USEPA, Washington, D.C. 5pp.

van Der Geest, H.G., Greve, G.D., Boivin, M.E., Kraak, M.H.S., van Gestel, C.A.M. 2000. Mixture toxicity of copper and diazinon to the larvae of the mayfly (*Ephoron virgo*) judging additivity at different effect levels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**:2900-2905.

van Gestel, C.A.M., Hensbergen, P.J. 1997. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**:1177-1186.

Villaverde, J., Hildebrandt, A., Martínez, E., Lacorte, S., Morillo, E., Maqueda, C., Viana, P., Barceló, D. 2008. Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal. *Science of the Total Environment*, **390**: 507-513.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. 2001. Principles of ecotoxicology. 2nd Ed. Taylor & Francis, New York. 309 pp.

Wan, M.T., Buday, C., Schroeder, G., Kuo, J., Pasternak, J. 2006. 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*, **76**: 52-58.

Wang, D., Weston, D.P., Lydy, M.J. 2009. Method development for the analysis of organophosphate and pyrethroid insecticides at low parts per trillion levels in water. *Talanta*, **78**:1345–1351.

Ware, G.E.; Whitacre, D.M. 2004. The pesticide book. 6th edition. Meisterpro Information Resources, 488 pp.

Xiu, R., Xy, Y., Gao, S. 1989. Toxicity of the new pyrethroid insecticide, deltamethrin, to *D. magna*. *Hydrobiologia*, **188/189**:411-413.

Zampireon, S., Vieira, J.2009.Poluição da água. Disponível em http://educar.sc.usp.br/biologia/textos/m_a_txt5.html consultado em 17 de Maio de 2009.

