

José Lopes Lima Coutinho

**Avaliação ecotoxicológica da exposição a uma
formulação comercial contendo dois pesticidas:
atrazina e s-metalocloro**



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2010

José Lopes Lima Coutinho

**Avaliação ecotoxicológica da exposição a uma
formulação comercial contendo dois pesticidas:
atrazina e s-metalocloro**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2010

José Lopes Lima Coutinho

**Avaliação ecotoxicológica da exposição a uma
formulação comercial contendo dois pesticidas:
atrazina e s-metalocloro**

**Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa
por José Coutinho, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de licenciado em Ciências Farmacêuticas.**

(José Lopes Lima Coutinho)

SUMÁRIO

O principal objectivo deste estudo foi determinar a toxicidade de um elutriado de solo, no qual foi aplicada uma formulação comercial de pesticidas contendo atrazina e s-metalocloro, e tentar prever o seu possível impacto no ambiente aquático, analisando os efeitos letais (mortalidade) e sub-letais (reprodução) provocados no crustáceo dulçaquícola *Daphnia magna*. Tendo em vista a prossecução desses objectivos, foram realizados testes de toxicidade agudos e crónicos. No sentido de avaliar a ocorrência de efeitos a curto e médio prazo, foram avaliados os efeitos de solos que receberam pesticida no ano da análise e no ano transacto. No sentido de avaliar a possibilidade de algumas alterações poderem advir da solubilização de contaminantes naturais do solo, foi igualmente testado o elutriado obtido a partir de solo no qual não foi aplicado pesticida. Observou-se que o elutriado correspondente ao solo no qual a aplicação do pesticida foi efectuada no ano transacto (2009) apresenta toxicidade crónica. Através deste estudo foi possível verificar que o solo que contém pesticida aplicado recentemente, não é tóxico para os invertebrados.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio e colaboração das pessoas e instituição, a quem expresso o meu agradecimento:

Ao Professor Doutor Bruno Nunes, um muito obrigado pelo tempo dispendido, paciência e dedicação, tornando possível a elaboração desta monografia.

À minha família por me acompanhar em todos os momentos, por todo o apoio, pela compreensão, pelos incentivos.

Aos amigos, sempre. Um obrigado pela sua amizade, companheirismo, boa disposição e apoio que sempre demonstraram.

A todos os professores, pelos conhecimentos que me foram transmitidos.

Índice

I.	Introdução.....	1
II.	Impacto da utilização dos pesticidas	2
II.1.	Pesticidas.....	2
II.2.	Consumo e contaminação da água na agricultura.....	3
II.3.	Situação dos pesticidas a nível nacional	4
II.4.	Pesticidas – Legislação	5
II.5.	Classes de Pesticidas.....	6
II.6.	Quantidade de pesticidas documentada em Portugal.....	9
II.7.	Pesticidas e a Saúde Humana.....	11
II.7.1.	Presença dos pesticidas no ambiente aquático – água para consumo humano.....	13
II.7.2.	Avaliação dos efeitos ambientais de xenobióticos antropogénicos.....	14
II.8.	Fontes de contaminação dos ecossistemas aquáticos em pesticidas.....	15
II.9.	Impacto dos pesticidas a nível terrestre e aquático: lixiviação.....	17
II.10.	A monitorização biológica.....	19
II.11.	Monitorização ecotoxicológica – <i>Daphnia magna</i> Straus	20
II.11.1.	Taxonomia e morfologia.....	21
II.11.2.	Reprodução	21
III.	Objectivo	22
IV.	Material e Métodos.....	23
IV.1.	Cultivo dos organismos-teste (<i>Daphnia magna</i> Straus)	23
IV.2.	Aplicação do pesticida	23
IV.3.	Colheita e preparação das amostras	25
IV.4.	Simulação do processo de lixiviação.	25
IV.5.	Metodologia usada no teste de toxicidade aguda.....	26
IV.6.	Metodologia usada no teste de toxicidade crónica.....	28

IV.7. Análise estatística.....	29
V. Resultados	30
V.1. Toxicidade aguda	30
V.2. Teste de toxicidade crónica.....	31
VI. Discussão.....	35
VI.1. Efeitos agudos	35
VI.2. Efeitos crónicos.....	36
VII. Conclusão	40
VIII. Bibliografia	41
IX. Anexos.....	50
IX.1. Anexo 1 adaptado de CE (2001).....	50
IX.2. Anexo 2 adaptado de Waxman (1998).....	52

Índice de ilustrações

Ilustração 1 - Adaptado a partir de Giulio e Hinton (2008): Distribuição de químicos nos ecossistemas aquáticos.	17
Ilustração 2 - A percolação dos pesticidas através do perfil dos solos (adaptado de Silva e Santos, 2007).	18
Ilustração 3 - Pulverizador com barra de bicos	24
Ilustração 4 - Preparação da colheita da amostra de terra.	25
Ilustração 5 - Placa de agitação e respectivo matraz	26

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Vendas de pesticidas em 2003 no mundo (adaptado a partir de Matthews 2006).....	8
Gráfico 2 - Número médio de neonatos produzidos por <i>Daphnia magna</i> num elutriado tratado sem pesticida	31
Gráfico 3 - Número médio de neonatos produzidos por <i>Daphnia magna</i> à 4ª ninhada num elutriado sem pesticida	32
Gráfico 4 - Número médio de neonatos produzidos por <i>Daphnia magna</i> num elutriado tratado com pesticida no ano transacto.....	33
Gráfico 5 - Número médio de neonatos produzidos por <i>Daphnia magna</i> à 4ª ninhada com pesticida do ano transacto.....	33
Gráfico 6 - Número médio de neonatos produzidos por <i>Daphnia magna</i> num elutriado tratado com pesticida no momento da colheita.	34

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação do pesticida e respectiva peste-alvo (Waxman, 1998).....	7
Tabela 2 - Vendas de herbicidas por grupo químico, adaptado de (Vieira, 2005).....	9
Tabela 3 - Vendas de produtos fitofarmacêuticos por tipo de função adaptado de (Vieira, 2005).....	10
Tabela 4 - Venda de produtos fitofarmacêuticos (ANIPLA, 2009).	11
Tabela 5 - Resultados do teste de toxicidade aguda, respectivo a duas réplicas	30

I. Introdução

Os pesticidas são substâncias químicas ou biológicas usadas para eliminar ou controlar espécies indesejáveis, interferindo nos processos bioquímicos e fisiológicos, comuns numa larga escala de organismos (Waxman, 1998 e Pretty, 2005). As três maiores classes de pesticidas são os inseticidas, os fungicidas e os herbicidas. Também existem rodenticidas (controlo de pestes provocadas por vertebrados, como os roedores), nematicidas, moluscicidas e acaricidas. Estes químicos são normalmente sintetizados a partir de compostos orgânicos, mas também há exceções, pois existem derivados de plantas ou produtos obtidos de minerais inorgânicos (Waxman, 1998).

Na segunda metade do século XX ocorreu um grande incremento na utilização de pesticidas na agricultura. A descoberta dos pesticidas organoclorados, com custos de produção baixos, permitiu a sua utilização em grande escala, sem ter atenção às eventuais consequências para a saúde humana, que nessa altura eram maioritariamente desconhecidas. No entanto, o controlo químico de pragas reduziu o índice de doenças para a espécie humana e para os animais. A população mundial encontra-se num crescimento constante, pelo que é necessário produzir alimentos capazes de suprir as necessidades de toda a Humanidade, livres de problemas fitossanitários e isentos de risco para a saúde. Esta é uma tarefa que só se consegue com moderna tecnologia agrícola, onde se incluem os pesticidas (Simões, 2005). Mas o homem tende a utilizar pesticidas de forma negligente, por razões económicas, levando a alterações no ecossistema, acumulação em organismos e presença na água.

Muitos dos pesticidas usados podem ser letais e outros podem provocar doença (Pretty, 2005). Os pesticidas organoclorados devido à sua lipofilia e elevado tempo de semi-vida, acumulam-se na cadeia alimentar. A genotoxicidade está entre os mais sérios dos possíveis danos causados pelos produtos químicos agrícolas e merece uma atenção especial devido à natureza irreversível do processo e ao longo período de latência associado à sua manifestação (Nunes e Tajara, 1998).

O destino dos pesticidas após alcançarem o solo ou a água depende das suas características químicas e físicas e da susceptibilidade para várias transformações e processos de transporte (Nunes e Tajara, 1998).

Estes podem atingir as águas superficiais e as águas subterrâneas, por fenómenos físicos como a lixiviação e a escorrência, tornando-se assim um problema para o Ambiente e a para a Saúde Humana. A agricultura encontra-se intimamente ligada ao meio aquático, pois qualquer produto aplicado numa exploração agrícola, pelos processos acima citados, pode ser encontrado no ambiente aquático, onde exercerá o seu efeito deletério. Assim, é conveniente uma avaliação integrada dos efeitos tóxicos entre o solo e a água.

II. Impacto da utilização dos pesticidas

II.1. Pesticidas

Os pesticidas são utilizados na agricultura em larga escala, pois permitem obter um aumento significativo da produtividade. Muitos destes pesticidas são usados para eliminar organismos indesejados. Assim, dentro dos pesticidas podemos ter insecticidas, herbicidas, moluscicidas, raticidas, piscicidas, e fungicidas, por exemplo. Todos estes compostos têm uma capacidade comum de interferirem negativamente com aspectos fundamentais da biologia das espécies-alvo, diminuindo a sua sobrevivência. Os pesticidas, para além de combaterem as pragas-alvo, como insectos, ervas daninhas e fungos, podem também afectar o ambiente, por acção tóxica sobre os animais selvagens, e interferir com a saúde do Homem. Uma quantidade significativa destes pesticidas podem ser letais e outros podem provocar doença, principalmente após exposições crónicas (Pretty, 2005). Por vezes, os pesticidas são utilizados de forma negligente, ou que contraria as instruções de utilização, levando à sua presença no ambiente e a alterações no ecossistema, acumulação em organismos não alvo e na água (Pretty, 2005).

Os pesticidas por intermédio de processos como a lixiviação e a escorrência de terrenos agrícolas, ou a deriva a partir do local de aplicação por dispersão atmosférica, contaminam as águas de superfície, mas também contribuem para a poluição das águas subterrâneas, devido ao seu transporte através de macroporos, sendo esta poluição condicionada pela concentração de pesticidas nas águas de superfície (Mickelson et al, 2001).

II.2. Consumo e contaminação da água na agricultura

Neste contexto é importante sensibilizar os agricultores para as preocupações com a questão da água considerando o seu papel fundamental para a sobrevivência e saúde da população humana.

No entanto, a agricultura moderna, industrializada e dependente da utilização de químicos (como o caso dos pesticidas tão bem reflecte) não pode ser encarada como “amiga do ambiente”. A produção rentável de alimentos para consumo humano requer uma crescente utilização de agentes que facilitem e rentabilizem todo o processo de produção, e esta rentabilização passa pela eliminação da concorrência biológica que diminui a quantidade de alimentos produzidos pelo Homem (Simões, 2005).

A agricultura é a actividade que consome mais água doce do Mundo. Estima-se que 70% da água doce usada em Portugal, Espanha e Grécia seja usada exclusivamente na rega. No entanto, a utilização de água é altamente variável de país para país: embora presente no mesmo continente, o uso de água na Inglaterra é inferior a 1%, devido à abundância da chuva (WBCSD, 2006). No entanto, o cenário acima exposto dos países mediterrânicos é demonstrativo do impacto negativo que os processos agrícolas colocam ao nível ambiental, nomeadamente pela utilização de água doce. A contaminação desta mesma água impede ou diminui a viabilidade da sua utilização, tanto para efeitos agrícolas como também para consumo directo humano.

II.3. Situação dos pesticidas a nível nacional

Os pesticidas em Portugal e na União Europeia sofrem processos de regulamentação cada vez mais exigentes, face à constante evolução proporcionada pela comunidade científica. O reconhecimento destas substâncias como potencialmente perigosas fez com que houvesse um esforço de regulamentação apertado, no sentido de impedir a sua aplicação e disseminação pouco criteriosa.

A agricultura sustentável foi implementada há duas décadas atrás, em 1992, com o objectivo de: “preservar a terra, a água e os recursos genéticos vegetais e animais, não degradar o ambiente e ser tecnicamente apropriada, economicamente viável e socialmente aceitável” (Amaro, 2007). A agricultura sustentável divide-se em duas vertentes: agricultura biológica e produção integrada. Porém, estas têm objectivos comuns, quanto à estabilidade dos ecossistemas, parâmetros ecológicos da qualidade, e à poluição, entre outros. Apresentem no entanto uma diferença fulcral: na agricultura biológica, é expressamente proibido o uso de adubos e pesticidas químicos, enquanto na produção integrada se pode usar, mediante uma evidência científica, que demonstre que não afecta a saúde humana e o ambiente (Amaro, 2007).

De acordo com Amaro (2007), nos últimos 15 anos, os serviços oficiais responsáveis pela regulamentação e fiscalização da homologação e do uso dos pesticidas agrícolas têm contribuído para que Portugal seja um membro da União Europeia, que luta para a “não proibição dos pesticidas”.

Em 2006, foi elaborado um plano interministerial de redução dos riscos dos pesticidas em França, que deu um grande ênfase à redução de 50% das substâncias activas consideradas mais perigosas (79% dessas são comercializadas em Portugal). Posto isto, e tendo em conta a Directiva do uso sustentável dos pesticidas, verificou-se que Portugal, em 2008, proibiu a utilização de alguns pesticidas utilizados em larga escala, como por exemplo a atrazina e o s-metalocloro, sobre os quais incide o presente estudo (DGAR, 2008; Amaro, 2007).

No ano transacto (2009), em Março, a Comissão Europeia anunciou a proibição da comercialização de 70 pesticidas, pois não superaram os controlos de segurança que determinam o seu efeito no meio ambiente e saúde humana. Foram analisadas mil substâncias, e 67% das mesmas foram eliminadas por falta de informação (NM., 2009).

Posto isto, verifica-se que houve, ao longo destes últimos anos, uma evolução positiva na diminuição de utilização de pesticidas em Portugal e na União Europeia, estabelecendo-se assim uma política que visa a prevenção e segurança da Saúde Pública e Ambiental.

II.4. Pesticidas – Legislação

A legislação referente aos pesticidas, colocados no mercado, encontra-se disposta na Directiva 91/414/CEE, transposta pelo Decreto de Lei 98/94, e teve como objectivo assegurar a harmonização da homologação dos pesticidas agrícolas e regulamentar a reavaliação dos pesticidas existentes na UE e a autorização dos novos pesticidas. Assim, de acordo com a legislação, um pesticida é homologado se o risco for aceitável, ou seja:

- 1) For suficientemente eficaz;

- 2) Não tiver qualquer efeito inaceitável sobre os vegetais ou os produtos vegetais;

- 3) Não ocasionar sofrimento ou dores inaceitáveis aos vertebrados a combater;

- 4) Não tiver qualquer efeito, directa ou indirectamente, prejudicial para a saúde humana ou animal ou para as águas subterrâneas;

- 5) Não exercer qualquer influência inaceitável no ambiente, no que respeita muito especialmente:

- Ao seu destino e disseminação no ambiente e, em particular na contaminação das águas, incluindo a água destinada a consumo humano e as águas subterrâneas;
- Ao impacto sobre as espécies não-visadas.

Logo, para tornar o uso dos pesticidas aceitável, é necessário o conhecimento da classificação toxicológica das substâncias activas e dos produtos formulados, das frases de risco e das frases de segurança identificadas pelas autoridades comunitárias e nacionais responsáveis (Amaro, 2007).

O Decreto-Lei n.º 506/99 fixa os objectivos de qualidade para determinadas substâncias, reconhecendo a fonte de contaminação e assegurando que a concentração da substância seja inferior aos limites propostos. Na lista II do anexo XIX ao Decreto-Lei n.º 236/98, verifica-se que o limite fixado para a substância em estudo no presente trabalho – atrazina – é de 1µg/l em águas interiores, estuarinas, de transição e em águas do litoral e territoriais.

A introdução das Directivas 80/778/CEE, 98/83/CE referente à qualidade da água de consumo humano e 2000/60/CE, conhecida como Directiva Quadro da Água, permitiram fixar as concentrações máximas admissíveis de pesticidas na água de consumo humano, 0,1µg/l para pesticidas individuais e de 0,5 µg/l para a totalidade de pesticidas presentes na água. Também se estabeleceram políticas tendo como base a protecção e gestão das águas, com o objectivo de preservar, melhorar e recuperar as águas, principalmente as subterrâneas, de forma a não perderem qualidade, condicionada pela contaminação com pesticidas (Pereira, 2003).

II.5. Classes de Pesticidas

Os pesticidas podem ser classificados de várias formas, como por exemplo:

- composição química,

Avaliação ecotoxicológica da exposição a um pesticida, contendo atrazina e s-metalocloro

- padrão de utilização (solo, foliar)
- tratamento da peste alvo (gramíneas - herbicida)
- tratamento de grupo de pestes (herbicidas, insecticidas)

Tabela 1 - Classificação do pesticida e respectiva peste-alvo (Waxman, 1998)

Grupo do Pesticida	Peste alvo
• Acaricida	• Ácaros, carraças, aranhas
• Avicida	• Passáros
• Bactericida	• Bacterias
• Fungicidas	• Fungos
• Herbicidas	• Ervas daninhas
• Insecticidas	• Insectos
• Moluscicida	• Caracóis e lesmas
• Nematicidas	• Nematodo
• Peixicida	• Peixes
• Rodenticida	• Roedores
• Alguicidas	• algas

- Do ponto de vista químico os pesticidas podem ser divididos em dois grandes grupos: os orgânicos e os inorgânicos. Os pesticidas inorgânicos não contêm carbono, são de origem mineral, constituídos por arsénio, cobre, boro, mercúrio, enxofre, estanho ou zinco. Nos dias de hoje estes pesticidas são pouco usados, e alguns até foram eliminados como é o caso do arsénio e do mercúrio (Waxman, 1998).

- Os pesticidas orgânicos começaram a ser utilizados após a Segunda Guerra Mundial, ou seja, depois do surgimento do diclorodifeniltricloroetano (DDT). A maior parte destes compostos é de origem sintética (Mathews, 2006).

As classes de pesticidas mais vendidas no mundo são os herbicidas, os insecticidas e os fungicidas (Mathews, 2006). Os pesticidas existentes no mercado pertencem a grupos químicos específicos, com diferentes mecanismos de acção.

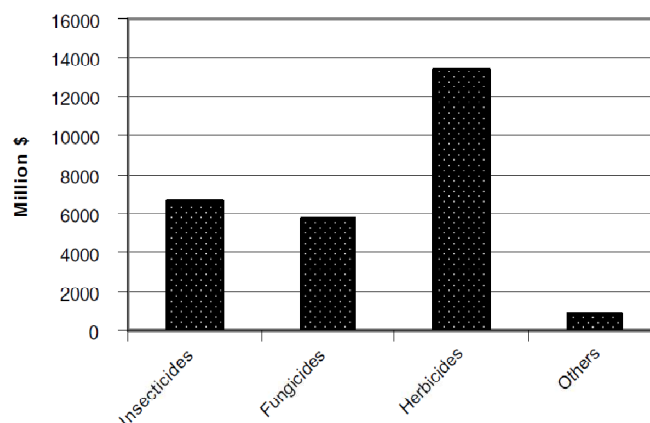


Gráfico 1 - Vendas de pesticidas em 2003 no mundo (adaptado a partir de Matthews 2006)

Os herbicidas, em geral, têm um amplo espectro de acção. Podem actuar sobre todas as ervas daninhas, embora possam ser selectivos. Existem vários tipos de herbicidas, e a sua classificação pode basear-se na natureza dos compostos químicos contidos no herbicida (anexo 2). Os herbicidas dividem-se em herbicidas orgânicos e herbicidas inorgânicos. Os herbicidas orgânicos são usados em larga escala hoje em dia, enquanto os herbicidas inorgânicos foram sendo gradualmente eliminados devido à sua elevada persistência no solo (Baird, 2002).

Como vemos no gráfico 1 os insecticidas são a segunda classe de pesticidas mais vendida no mundo. Estes compostos são usados na agricultura, mas também em nossa casa. Podem possuir acção local ou acção sistémica. Os insecticidas de acção local, são aplicados na superfície da planta ou objecto e actuam directamente sobre a praga, controlando o desenvolvimento da mesma. Por sua vez os insecticidas de acção

sistémica são absorvidos de forma relativamente rápida pela planta e transportados pelo sistema vascular (Matthews, 2006). O pesticida entra na planta dependendo do modo de aplicação, podendo entrar pelas raízes ou partes superiores ao solo. Os fungicidas actuam sobre fungos, protegendo culturas, frutos e flores, entre outros. Esta protecção é conferida no armazenamento, em transporte, mas também no momento da cultura. Os fungicidas podem ser classificados como protectores (de superfície) e curativos (sistémicos ou internos).

II.6. Quantidade de pesticidas documentada em Portugal

Em Portugal existe um controlo do valor de vendas dos pesticidas em cada ano. O organismo responsável pela publicação destes dados é a Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC). De acordo com o Artigo 26º, Decreto-Lei nº 94/98 de 15 de Abril, a Associação Nacional da Indústria para a Protecção das Plantas (ANIPLA) e restantes empresas que comercializam produtos fitofarmacêuticos, declaram à DGPC as vendas por substância activa.

Procedendo a uma análise da tabela 2, verifica-se que os fungicidas representam 76%, os herbicidas 13,9%, e os insecticidas/acaricidas 6,3% das vendas em Portugal, de um total de 17 mil toneladas de pesticidas. Tendo em conta os herbicidas em estudo, verifica-se que a atrazina se inclui no grupo químico das substâncias mais vendidas, as triazinas (15.1%). O s-metalocloro pertence à classe química “outros” (na qual se inclui o grupo químico das cloroacetanilidas), com uma representação a nível nacional de 70,4% do mercado (Tabela 3).

Tabela 2 - Vendas de herbicidas por grupo químico (substância activa) adaptado de (Vieira, 2005), o valor de vendas (expresso em kg de substância activa, por grupo químico) encontra-se na tabela 2. Nesta tabela o item “Outros produtos” diz respeito aos atractivos, molhantes, e os outros adjuvantes, sinérgicos e repulsivos.

Grupo químico	Quantitativo vendido (kg)
Amidas e anilidas	11 572
Carbamatos	114 711
Fenoxi-fitohormonas	84 407
Triazinas	361 558
Dinitroanilinas	18 924
Ureias, sulfonilureias e uracilos	113 751
Outros	1 676 626
Total	2 381 549

Avaliação ecotoxicológica da exposição a um pesticida, contendo atrazina e s-metalocloro

Tabela 3 - Vendas de produtos fitofarmacêuticos por tipo de função adaptado de (Vieira, 2005)

	kg
TOTAL	17 030 910
Fungicidas	12 954 391
Inorgânicos	11 084 776
Cúpricos	851 136
Enxofre	10 232 782
Outros	858
Benzimidazóis	27 513
Diazóis e triazóis	23 396
Diticarbamatos	1 110 567
Outros	708 139
Herbicidas	2 381 549
Amidas	11 572
Carbamatos	114 711
Derivados da ureia, uracilos e sulfonilureias	113 751
Dinitroalaninas	18 924
Fenoxi-fitohormonas	84 407
Triazinas	361 558
Outros	1 676 626
Insecticidas e acaricidas	505 458
Carbamatos	35 283
Organoclorados	46 814
Organofosforados	315 670
Piretróides	7 032
Produtos de origem vegetal e biológicos	1 236
Outros	99 423
Moluscicidas	27 467
Reguladores de crescimento	2 766
Anti-abrolhantes	490
Reguladores de crescimento	2 276
Rodenticidas	29
Óleo mineral	582 325
Fumigantes de solo	549 185
Outros produtos	27 740

Em 2009 a ANIPLA reportou que em 2008 foram vendidas 22,4 mil toneladas de pesticidas. Levando em consideração que esta associação controla a maior parte do negócio dos fitofármacos, podemos dizer que num período de 5 anos o consumo de pesticidas aumentou consideravelmente (Tabela 4).

Tabela 4 - Venda de produtos fitofarmacêuticos (ANIPLA, 2009).

Mercado Segmentos	Valor (mil euros)	Variação % (1)	Quantidade (t)	Variação % (1)
Fungicidas	44.160	15%	14.723	8%
Insecticidas	14.211	-19%	2.217	-21%
Herbicidas	36.542	11%	4.107	-20%
Diversos	4.783	13%	1.382	-9%
Total	99.696	5,8%	22.429	-2,6%

(1) A variação refere-se a igual período do ano anterior

II.7. Pesticidas e a Saúde Humana

O grande problema da contaminação ambiental e da exposição humana aos pesticidas deve-se ao facto de estes compostos serem formulados e introduzidos no ambiente com o objectivo de controlar e levar à morte dos seus organismos-alvo. No entanto, a maioria deles actua sobre sistemas biológicos vitais, sem actividade sobre organismos específicos, logo também acabam por se tornar potencialmente tóxicos para os seres humanos e outras espécies selvagens.

A Organização Mundial de Saúde fez uma estimativa sobre a intoxicação aguda por pesticidas, tendo verificado que existem 3 milhões de casos anuais de intoxicações (WHO, 1990). Destes, 1 milhão resultam de exposição não intencional, sendo principalmente afectados os trabalhadores das explorações agrícolas e habitantes destas zonas. Os restantes 2 milhões resultam da contaminação indirecta, através da ingestão de água e alimentos contaminados (WHO, 1990).

Uma grande parte da classe dos insecticidas é neurotóxica, provocando alterações no sistema nervoso. Considerando que estes compostos não têm actividade selectiva e afectam outras espécies além dos organismos-alvo, algumas das reacções adversas centram-se nas alterações do sistema nervoso de organismos contaminados. O mecanismo de toxicidade e a forma como o sistema nervoso é afectado é semelhante em todas as espécies e apenas a dose de tóxico determina a intensidade do efeito biológico (Waxman, 1998). O processo pelo qual causam neurotoxicidade é variável, de acordo com a classe química dos pesticidas a considerar.

O caso do DDT (diclorodifeniltricloroetano; um pesticida organoclorado) é exemplificativo: este composto age sobre mecanismos de despolarização e repolarização das células nervosas, actuando sobre a membrana do axónio, alterando o transporte de iões, o que afecta a transmissão eléctrica. Isto resulta numa estimulação repetitiva dos nervos, causando tremores pelo corpo e convulsões (Waxman, 1998).

Os pesticidas piretróides agem de maneira similar aos organoclorados, embora os piretróides do tipo II tenham maior tempo de actividade, causando uma despolarização persistente e uma excitação repetitiva dos órgãos sensoriais e fibras musculares (Williams et al, 2000).

Os organofosforados e os carbamatos actuam no sistema nervoso inibindo as enzimas colinesterases. As colinesterases actuam na degradação da acetilcolina, neurotransmissor responsável pela transmissão dos impulsos no sistema nervoso. Quando acontece a inibição da enzima, há acumulação de acetilcolina na fenda sináptica, que provoca uma excitação constante. Os sintomas mais comuns por intoxicação aguda são: convulsões, aumento da sudorese e activação das glândulas secretoras, entre outros (Williams et al, 2000).

Para além dos mecanismos de acção típicos de cada classe de pesticidas, muitos dos seus efeitos tóxico ambientais podem ocorrer por outros processos. No caso dos organoclorados, foi demonstrado que exposição ao DDT ou aos seus metabolitos pode causar problemas reprodutivos (Snedeker, 2001).

Assim, e no sentido da avaliação da perigosidade que cada um destes agentes coloca para o meio ambiente, existem instituições que trabalham no sentido de avaliar os efeitos dos diversos pesticidas em múltiplos organismos. Tal é o caso da United States - Environmental Protection Agency (US-EPA) que possui na sua estrutura organizacional, um departamento chamado Office of Pesticide Programs, onde se está sediada a Health Effects Division, que realiza estudos em animais de forma a avaliar o potencial risco de cada pesticida (EPA, 2009).

II.7.1. **Presença dos pesticidas no ambiente aquático – água para consumo humano**

De uma forma geral, a qualidade da água deve ser avaliada através do uso de parâmetros físicos, químicos e biológicos de forma a fornecer um espectro alargado de informação para uma monitorização das águas correcta e apropriada. Assim como principais parâmetros físicos destacam-se a cor, a turbidez e a temperatura; como parâmetros químicos podemos encontrar o pH, o oxigénio dissolvido e salinidade; os parâmetros biológicos mais comuns referem-se aos coliformes fecais e presença de clorofila a (proliferação da flora aquática) (Peixoto, 2008). Os organismos presentes em ambiente aquático como é o caso da *Daphnia magna*, são indicadores da qualidade da água. Pois, se houver qualquer alteração na qualidade da água, haverá uma alteração física, comportamental ou reprodutiva no organismo.

Um dos passos no sentido de garantir essa monitorização correspondeu à implementação da Directiva Quadro da Água, DQA (Water Economics Working Group, WATECO e European Commission, 2003). De acordo com a DQA foram identificadas as “substâncias perigosas prioritárias”; nesta lista (anexo 1) encontra-se a atrazina, para a qual foram feitos acordos internacionais no sentido de cessar a utilização deste composto. Nesta Directiva faz-se uma alusão intensa ao estado ecológico do ecossistema, por isso é apelidada como a directiva responsável pela “integração ecológica europeia”, estabelecendo meios de controlo, através de um estudo mais pormenorizado da comunidade biótica. De acordo com Oliveira et al (2006), na DQA verificou-se a apresentação do conceito “qualidade ecológica” - este foi inserido com o objectivo de desenvolver um quadro de avaliação da qualidade da água mais abrangente. A DQA integra todos os aspectos relacionados com a gestão da água que anteriormente se encontravam dispersos em várias directivas sectoriais e tem como principal objectivo a definição de um enquadramento para a protecção e utilização sustentável das águas na União Europeia. Esse enquadramento definido pela directiva visa alcançar a protecção de todas as águas (WATECO e CE., 2003).

A Directiva Quadro da Água (EU, 2000) tem como principal objectivo a definição de um enquadramento para a protecção e utilização sustentável das águas da União

Europeia. Por razões económicas é necessário preservar a qualidade e a quantidade da água, pois a remediação de tal facto imputará maiores custos. Muitos dos rios presentes no nosso país nascem no país vizinho, e para se ter qualidade da água desses rios é necessário que os dois países contribuam para o seu “bom estado”. A DQA estabelece políticas neste sentido. Segundo Rocha (2001), antes da DQA, as águas que não tivessem nenhuma utilização eram designadas “orfãs”, não possuindo assim estatuto de protecção; actualmente os parâmetros de qualidade não são estabelecidos em função das utilizações humanas, mas do próprio ecossistema aquático. O enquadramento teórico da DQA aponta claramente para uma visão moderna de gestão integrada dos recursos naturais, o que implica a necessidade das entidades gestoras se equiparem com modernos instrumentos de análise para suporte à decisão (Oliveira et al, 2006). Oliveira, et al (2006) afirmam que os objectivos estabelecidos pela DQA associados ao programa de monitorização, são os exercicios de intercalibração das condições de referência e a definição dos critérios de qualidade e padronização de métodos de recolha e análises. Os programas de monitorização incluem frequentemente amostragem de água em diferentes locais e determinação de um determinado número de parâmetros físico-químicos e biológicos, o que conduz à elaboração de uma matriz com um grande número de dados, cuja interpretação é, por vezes, complexa (Simeonov, 2003). O exercício de intercalibração das condições de referência, ao qual corresponde o “estado ecológico excelente” permite em associação com os valores resultantes da monitorização da qualidade da água interpretar os “rácios de qualidade ecológica”, avaliando e quantificando a relação entre os valores observados e os verificados em condições de referência, para o mesmo meio hídrico (Oliveira, et al., 2006). A qualidade da água é assim algo complexo porque engloba muitas variáveis; no entanto, pode ser definida como uma combinação de concentrações de substâncias inorgânicas ou orgânicas, mas também, através da composição e estado dos seres vivos que habitam o meio aquático (Rocha, 2001).

II.7.2. Avaliação dos efeitos ambientais de xenobióticos antropogénicos

Para se verificar o impacto de tóxicos no ambiente pode-se começar pelos testes ecotoxicológicos. De acordo com Hodgson et al. (1998) a Ecotoxicologia é definida

como: "a ciência que se ocupa da acção dos agentes químicos e físicos nos organismos, populações, e sociedades dentro dos ecossistemas definidos incluindo a transferência de substâncias e interações no ambiente". Assim, pode dizer que a Ecotoxicologia verifica e avalia quais os efeitos tóxicos provocados num grupo de organismos. No âmbito do presente trabalho, pretendeu avaliar-se os efeitos eventualmente causados pela utilização e dispersão de um agente antropogénico da classe dos pesticidas (nomeadamente, o s-metalocloro e a atrazina), formulados por intermédio da mistura com nome comercial Primestra Gold S®.

Esta avaliação ecotoxicológica do pesticida Primestra Gold S® (constituído por s-metalocloro e atrazina) teve por objectivo a realização de uma análise dos efeitos de elutriados de três amostras de solo agrícola ao nível de organismos aquáticos: uma das amostras foi constituída por solo onde não ocorreu aplicação de qualquer pesticida num período mínimo de cinco anos; uma segunda amostra correspondeu a solo com pesticida aplicado no ano anterior; e uma última amostra constituída por solo com a aplicação do pesticida no momento da sua recolha. Com base nesta análise pretendeu-se efectuar uma comparação entre os diversos solos tendo em conta os potenciais efeitos de degradação, a curto, médio e longo prazo, dos agentes pesticidas utilizados. A avaliação ecotoxicológica pretendida foi efectuada utilizando como parâmetro a mortalidade (após exposição aguda) e os efeitos populacionais e reprodutivos (número de neonatos) de um clone da espécie de cladóceros de água doce, *Daphnia magna*, mantida em condições laboratoriais controladas. Assim, pretendeu-se observar os efeitos que poderão surgir, com diferentes intervalos temporais, da aplicação de pesticidas no ambiente aquático, como consequência da sua aplicação num terreno agrícola e num cenário real.

II.8. Fontes de contaminação dos ecossistemas aquáticos em pesticidas

Com o advento da Revolução Industrial, verificou-se um aumento da capacidade humana em modificar o meio ambiente. Observa-se desta forma que o Homem ao promover estas alterações contribui também para a extinção de espécies e modificações dos processos naturais. Assim, após o início da Revolução Industrial têm sido lançados nos ecossistemas aquáticos um grande número de substâncias, obtidas por via de síntese química, cuja toxicidade é actualmente um dos maiores problemas ambientais. Os

pesticidas foram aplicados durante anos de uma forma negligente, assumindo-se que os ecossistemas terrestre e aquático suportavam estes resíduos, ou que então os faria desaparecer. Esta ideia persistiu por longos anos, devido à escassa informação e falta de formação dos aplicadores de pesticidas. Os pesticidas provocaram alterações a vários níveis, de entre as quais se destaca o ecossistema aquático (Barroso, 2009). No caso particular dos organismos aquáticos, os seus alimentos podem encontrar-se contaminados devido ao contacto com a água ou sedimentos. Os organismos aquáticos podem então acumular estes químicos por ingestão do alimento contaminado, pelo contacto das suas superfícies respiratórias e pelo seu contacto directo com a água contaminada (Giulio e Hinton, 2008). Pelo facto de poderem estar contaminados aquando do seu consumo pelo Homem, podem servir de vectores preferenciais de contaminação humana (Giulio e Hinton, 2008).

Um aspecto importante nesta cadeia de eventos é a especiação química, ilustrada pelos gráficos circulares presentes na ilustração 1. Muitos dos químicos existem no Ambiente sob variadas formas, muitas vezes resultantes de reacções químicas e bioquímicas. As identidades e concentrações relativas das espécies químicas variam com a localização e o tempo e diferem entre os componentes do ecossistema aquático. Logo, um dado organismo aquático pode ser exposto a uma grande quantidade de químicos. A acumulação química e toxicidade não dependem só da quantidade de químico presente no ambiente, mas também da sua biodisponibilidade, e da capacidade com que o organismo aquático o absorve e distribui nos vários órgãos. Assim, o químico pode ser mais susceptível para se ligar a um local de acção específico, dependendo da espécie química em questão e das características específicas do organismo que a absorve (Giulio e Hinton, 2008). Após a sua absorção, o tóxico ambiental pode exercer efeitos nefastos na fisiologia do organismo.

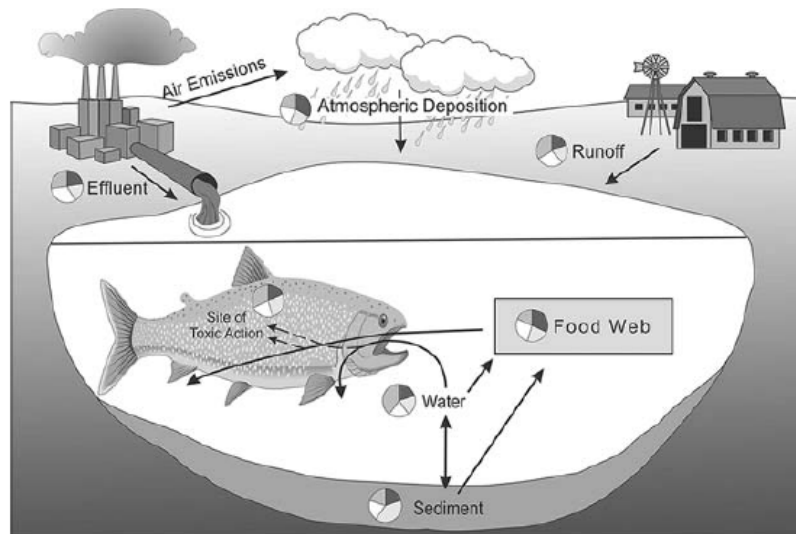


Ilustração 1 - Adaptado a partir de Giulio e Hinton (2008): Distribuição de químicos nos ecossistemas aquáticos, os gráficos de circulares representam qualitativamente a especiação química e como ela difere entre os compartimentos do ecossistema.

II.9. Impacto dos pesticidas a nível terrestre e aquático: lixiviação

Um solo diz-se contaminado quando contém substâncias, em quantidade ou concentração, que podem produzir efeitos nefastos, directa ou indirectamente, ao homem ou ao ambiente (Graff, 1989). Os pesticidas pertencem a uma classe de contaminantes muito importante devido ao seu tempo de retenção no solo ser por vezes muito elevado (Spadoto, 2002), e por serem potenciais fontes de poluição dos aquíferos (Gish et al. 1998; Smith, 1993), pelo facto de possuírem um elevado potencial de drenagem, uma elevada persistência no solo, uma degradação lenta por hidrólise, uma baixa pressão de vapor, uma baixa a moderada solubilidade em água, e uma moderada absorção pela matéria orgânica e argila existente no solo (Augusto, 2004).

O destino dos pesticidas, após alcançarem o solo ou a água, depende das suas características químicas e físicas e da susceptibilidade para várias transformações e processos de transporte (Hamilton e Crossley, 2004).

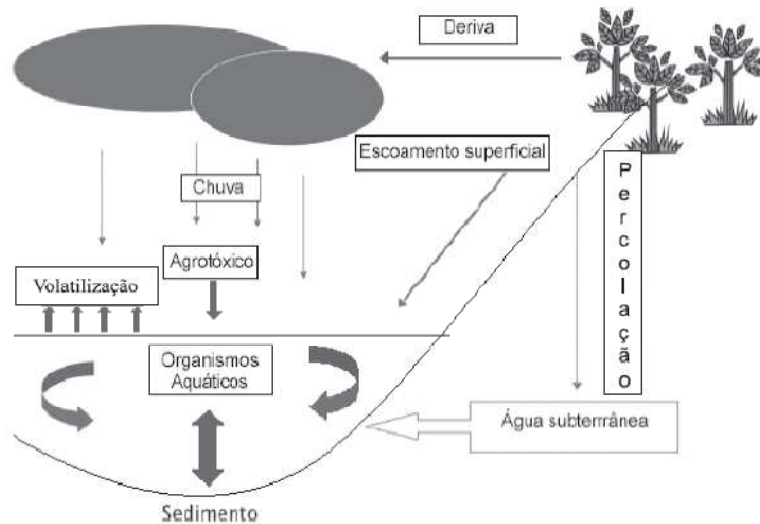


Ilustração 2 - A percolação dos pesticidas através do perfil dos solos (adaptado de Silva e Santos, 2007).

O conhecimento dos processos envolvidos no destino dos pesticidas a nível ambiental é essencial para garantir que a sua aplicação é eficaz e ambientalmente segura, porque assim se pode minimizar a possibilidade de ocorrência de muitos dos processos indesejáveis (Batista, 2003). Quando um pesticida é aplicado numa colheita, grande parte deste é absorvido pela planta ou animal alvo, ou também pode ser degradado por acção microbiana e química. Uma parte do pesticida mantém-se no ambiente: algum é vaporizado e eventualmente depositado por precipitação, outro mantém-se no solo, à superfície ou em águas subterrâneas por escorrência ou lixiviação (Anderson, 1986). Os pesticidas têm sido detectados na precipitação, podendo ser transportados por longas distâncias. Exemplificativo deste facto foi o caso da detecção de lúndano num lago japonês onde não havia fluxos de água superficiais ou subterrâneas. A sua presença neste local levou a supor que tivesse percorrido cerca de 1500 km, a partir da China ou Coreia (Anderson, 1986).

Após aplicação, uma dos factores determinantes para a biodisponibilidade e actuação tóxica dos pesticidas é a interacção com as partículas do solo. Quando os pesticidas são adsorvidos pelos componentes do solo ficam menos disponíveis para sofrerem lixiviação ou degradação microbiana. Uma vez desadsorvidos serão mais facilmente degradados, lixiviados ou absorvidos por plantas. Sendo assim, o solo é um elemento

determinante do destino final dos pesticidas, dependendo da maior ou menor afinidade dos pesticidas para este compartimento e suas propriedades intrínsecas (Nunes, 2006). De acordo com Silva e Santos, 2007 a percolação dos pesticidas através do perfil dos solos pode dar origem à contaminação dos lençóis freáticos (ilustração 2).

II.10. A monitorização biológica

A utilização de material biológico para avaliar a qualidade da água tem como vantagem as respostas biológicas integrarem um grande número de condições físico-químicas e os seres vivos detectarem alterações no ecossistema, mesmo que muito subtis (Rocha, 2001). De entre os diversos organismos que podem ser utilizados em estudos ambientais, com vista à quantificação de efeitos biológicos decorrentes da contaminação química, muitos organismos foram já sugeridos por instituições internacionais. Assim, a Environmental Protection Agency (Estados Unidos da América) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) publicaram normas de ensaios ecotoxicológicos que visam a avaliação de efeitos em peixes, moluscos, crustáceos, aves e plantas. No entanto, grande ênfase foi dada aos macro-invertebrados, devido às suas características inerentes.

Segundo Picanço (2007), os sistemas de macroinvertebrados apresentam características que podem ser muito vantajosas em estudos de monitorização ambiental, tais como:

- Os macroinvertebrados têm reduzidos movimentos de dispersão, quando comparados com outros grupos faunísticos;
- Têm um longo período de vida aquática, contrariamente, por exemplo, às algas;
- Podem ser fácil e rapidamente identificados;
- Possibilitam a determinação de vários tipos de impacto, sendo utilizados em estudos de poluição;

- São geralmente abundantes;
- Ocupam uma grande variedade de microhabitats;
- Providenciam uma ligação crucial com os níveis tróficos superiores;
- São importantes do ponto de vista económico visto serem a fonte de alimento de várias espécies de peixes demersais e de invertebrados epibentónicos consumidos pelos humanos;
- São importantes na reciclagem de nutrientes presentes no sedimento

Quando a monitorização biológica se baseia na determinação e quantificação da substância química ou do seu metabolito no meio biológico, é essencial o conhecimento de como a substância é absorvida pelas diferentes vias; como é distribuída pelos diversos compartimentos do organismo; se acumula ou não no organismo; de como é biotransformada; e finalmente como é excretada. Será igualmente necessário conhecer o mecanismo de acção da substância química para identificar quais os efeitos causados no organismo, logo se se identificar um efeito precoce pode-se usá-lo para fins preventivos, no sentido de evitar a toxicidade do ecossistema.

Segundo Amorim (2003) a avaliação biológica da exposição a substâncias químicas só é possível se existirem informações toxicológicas referentes ao mecanismo de acção e à toxicocinética dos agentes químicos aos quais os indivíduos estão expostos.

II.11. Monitorização ecotoxicológica – *Daphnia magna* Straus

A Ecotoxicologia estuda os efeitos adversos causados aos organismos vivos por substâncias químicas libertadas no ambiente pela realização de testes ecotoxicológicos (Stringhini e Salomon, 2004). Este tipo de abordagem permite conhecer e caracterizar as respostas tóxicas que uma dada substância, matriz ou mistura (no seu conjunto), provoca no organismo-teste utilizado. Como os ensaios ecotoxicológicos não dependem

da substância química se encontrar ou não isolada, eles preenchem as lacunas deixadas pelas análises químicas, que apenas nos indicam qual e a quantidade em que os contaminantes possam estar presente, sem nada informar sobre os potenciais efeitos biológicos. Os ensaios ecotoxicológicos tem por finalidade, saber se as substâncias químicas, isoladas ou em forma de mistura, são nocivas a sistemas vivos, e como e onde se manifestam os seus efeitos (Stringhini e Salomon, 2004). Entre os vários organismos-teste utilizados na toxicologia aquática de água doce, o mais usado é o cladóceros da espécie *Daphnia magna*. O teste ecotoxicológico com este organismo encontra-se padronizado pela OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) e ISO (International Organization for Standardization) (Picado et al., 2007).

II.11.1. Taxonomia e morfologia

Daphnia magna é um microcrustáceo da comunidade zooplancónica que pertence à classe *crustacea*. Estes organismos actuam como consumidores primários, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado e microorganismos. Habitam em charcos, pântanos e corpos de água, ricos em matéria orgânica. É vulgarmente conhecida por pulga de água, possui respiração branquial e pode atingir os 5 a 6 mm de comprimento. Estes crustáceos, tal como referido, alimentam-se pela captura de partículas em suspensão, através da atracção de cargas opostas das partículas e a superfície de um filtro composto por cerdas finas dos apêndices. Esta estrutura capta partículas da corrente hídrica, transferindo-as para o sulco alimentar, e posteriormente para a boca. A excreção é realizada por glândulas (Brentano, 2006).

II.11.2. Reprodução

A reprodução dos cladóceros é realizada habitualmente por partenogénese, sendo quase desconhecidos os machos. Os ovos diplóides partenogénicos são produzidos em cachos e incubados numa câmara incubatória dorsal localizada por baixo da “carapaça”. O desenvolvimento é directo e os neonatos são libertados da câmara incubatória por flexão ventral de pós-abdómen da fêmea. Os ovos partenogénicos são libertados por várias gerações, e uma fêmea pode produzir várias ninhadas. Por vezes, alguns factores como a

temperatura da água e a redução do alimento induzem o aparecimento de machos, e são produzidos ovos fertilizados (Brentano, 2006). Os ovos fertilizados são grandes, pois só são produzidos dois por ninhada. As paredes da câmara incubatória encontram-se então transformadas numa cápsula protectora em forma de sela (efípia) (Brentano, 2006). Esta é libertada na próxima muda, ou separando-se do exosqueleto, ou permanecendo com o resto do mesmo. As efípias flutuam, afundam, aderem a objectos podendo suportar tanto altas como baixas temperaturas. Nesta fase podem suportar até a passagem pelo intestino dos peixes, das aves e dos mamíferos que se alimentam de peixes (Brentano, 2006). A partir destes ovos resistentes, os cladóceros podem dispersar pelo vento, ou através de animais por longas distâncias e sobreviver ao inverno e às secas (Brentano, 2006). Existem assim quatro períodos no ciclo de vida desta espécie: ovo, juvenil, adolescente e adulto. O ciclo de vida, do ovo até à morte, varia de acordo com o decréscimo da temperatura. A 20°C a média do ciclo de vida da *Daphnia magna* (ovo a adulto é de 56 dias) (Brentano, 2006).

III. Objectivo

O presente trabalho tem como objectivo contribuir para a compreensão dos efeitos perniciosos causados pela aplicação de dois pesticidas, avaliando a qualidade da água lixiviada, utilizando parâmetros de mortalidade e populacionais do microcrustáceo *Daphnia magna*. Procurou-se desenvolver uma metodologia de análise de toxicidade crónica, tendo em conta os valores de toxicidade aguda e simulação do processo de lixiviação. Pretendeu-se obter valores de toxicidade, que pudessem servir de referência para a determinação do impacto ao nível aquático decorrente da utilização agrícola de uma mistura de atrazina e s-metalocloro formulado no produto de produto comercial do Primestra Gold S.

Pretendeu-se igualmente verificar a persistência do produto Primestra Gold S® no solo quando aplicado até um prazo de um ano e efeitos tóxicos daí decorrentes.

Como último objectivo, pretendeu-se comparar a toxicidade provocada pelo pesticida, quando este é aplicado dois anos sobre o mesmo solo.

IV. Material e Métodos

IV.1. Cultivo dos organismos-teste (*Daphnia magna* Straus)

Os organismos teste foram cultivados em água previamente desclorinada, e foram mantidos em lotes de 20 organismos em recipientes com um litro de água, com luz artificial (fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuridão) e temperatura de 20 ± 2 °C . O meio de cultura era renovado uma vez por semana. Os neonatos eram retirados durante um período de 24 horas do recipiente de cultura e colocados num novo recipiente de cultura (para se obter um padrão de eclosão), com o objectivo de ter lotes de organismos jovens e sincronizar o momento de eclosão. Ao fim de 40 dias os adultos eram descartados.

Estes organismos foram alimentados com uma suspensão de fermento granulado comercial. Para efectuar a preparação do alimento colocava-se 2,0 g de fermento num frasco de colheita de 60 ml, ao qual se adicionava água até perfazer o volume, de forma a obter uma suspensão homogénea. Posto isto, a alimentação era feita com uma pipeta de Pasteur, pelo que se aplicava uma ou duas gotas por cada grupo de 4 organismos por dia, tendo em conta o seu ciclo de vida (fase juvenil ou adulto respectivamente).

IV.2. Aplicação do pesticida

O pesticida Primestra Gold S foi aplicado no terreno por um pulverizador com barra de bicos (Ilustração 3). Foi estabelecida uma área de aplicação de 2200m². O limite máximo de aplicação de pesticida é de 4,5 litros por 10000 m², como indica no folheto informativo do Pesticida Primestra Gold®. Na preparação da diluição do pesticida ou “calda” (água+pesticida), colocou-se 1 litro de pesticida, que é dose recomendada para a respectiva área. A diluição foi de 1/80 (aproximadamente) em água.



Ilustração 3 - Pulverizador com barra de bicos

IV.3. Colheita e preparação das amostras

Para que uma amostra seja suficientemente representativa a sua colheita deve seguir as normas existentes, tal como o Decreto-lei n.º 118/ 2006, 21 Julho, bem como a norma ISO 10381-1: Qualidade do Solo - Amostragem -Parte 4. O equipamento a usar para a colheita deve estar isento de contaminantes ser resistente e fácil de usar. O equipamento usado na recolha das amostras para o presente projecto foi uma pá e três recipientes para colocar as amostras. No ponto de colheita seleccionada para a amostra, colheu-se uma amostra parcial ou igual a 20 cm de profundidade. A colheita foi realizada numa área de 0,5 m². A terra foi misturada nesta área, retirando-se as partículas de maiores dimensões, de forma a obter uma amostra homogénea do terreno em questão.



Ilustração 4 - Preparação da colheita da amostra de terra.

IV.4. Simulação do processo de lixiviação.

A amostra colhida foi submetida a um processo de lixiviação, com visto à obtenção de um elutriado, que contivesse a fracção hidrossolúvel dos pesticidas aplicados. Este processo consistiu na agitação da amostra de terra em água isenta de cloro (similar à utilizada para cultivar os organismos teste). Efectuou-se a pesagem de 500 g de cada amostra de terra para um matraz de 2 l de colo largo, adicionou-se 1,5 l de água

previamente desclorinada. Colocou-se o matraz sobre uma placa de agitação, durante um período de 2 horas, e com agitação contínua.

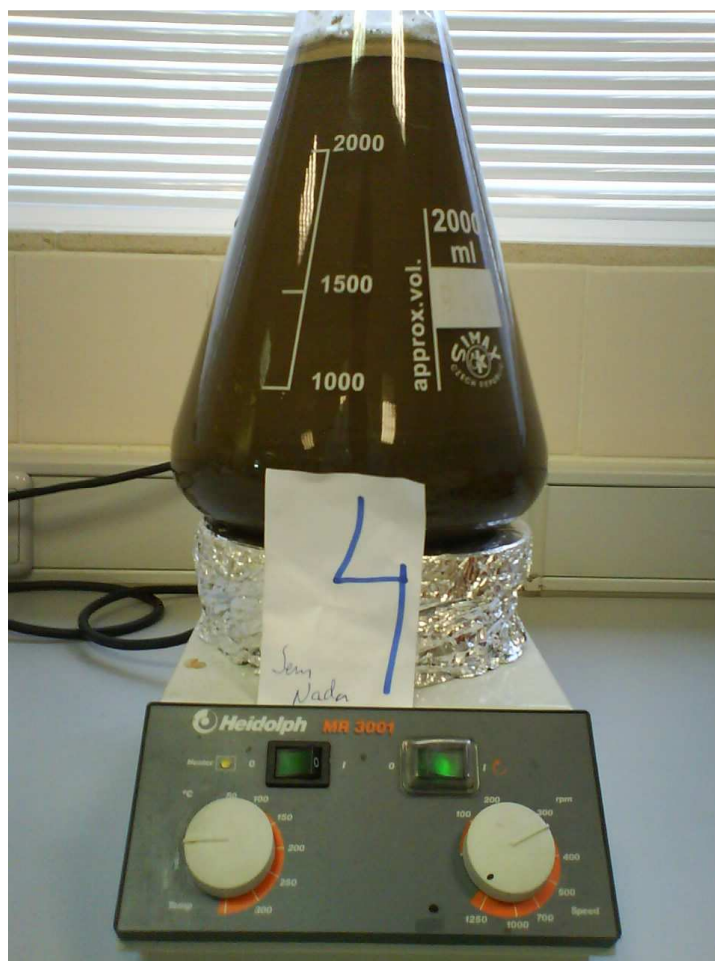


Ilustração 5 - Placa de agitação e respectivo matraz

Após 2 horas de agitação, deixou-se repousar 30 minutos, e depois procedeu-se à decantação e filtração do lixiviado, com a ajuda de uma coluna preenchida com algodão cardado. Este processo foi repetido por duas vezes, com o objectivo de ter um volume suficiente de lixiviado para realizar os ensaios.

IV.5. Metodologia usada no teste de toxicidade aguda

A metodologia usada no teste de toxicidade aguda seguiu o descrito na norma OECD “*Daphnia sp.*, Acute immobilisation Test and reproduction Test” (OECD, 1984). No

sentido de cumprir os requisitos da presente norma, as amostras de lixiviado foram testadas tendo como base a exposição a neonatos de *Daphnia magna*, com idade compreendida entre 1 a 24 horas de idade, por um período de 24 horas.

A partir da amostra de elutriado de cada amostra de terreno, foram preparadas 3 diluições, e um controlo. As diluições preparadas foram de 25%, 50%, 75% de elutriado. Usou-se também elutriado sem diluição que correspondeu ao tratamento 100%. As diluições foram preparadas com água potável, previamente desclorinada, proveniente da rede de distribuição pública. As três amostras em análise foram colocadas em frascos de acordo com as respectivas diluições; o teste foi feito em duplicado. Foram testados 6 organismos por cada frasco.

Os organismos-teste foram adicionados aos frascos, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. Os frascos foram cobertos com filme de PVC, e incubados no escuro dentro de uma caixa de PVC (ilustração 6), sem iluminação e alimentação, durante 24 horas.



Ilustração 6 - Câmara de incubação

Após este período de tempo, observou-se a quantidade de indivíduos imóveis, por concentração e por réplica.

IV.6. Metodologia usada no teste de toxicidade crônica

A metodologia usada no teste de toxicidade crônica seguiu o descrito na norma “OCDE guidelines for testing of chemicals, *Daphnia magna* reproduction test” (OECD, 1998). Este teste consistiu na exposição dos neonatos da *Daphnia magna*, a várias diluições do efluente em estudo, num período de 21 dias.

O ensaio foi realizado em duplicado, contendo três diluições (25%, 50%, 75%), um elutriado 100% e um tratamento controlo com água desclorinada. Para cada diluição foram usados 4 organismos por frasco. Cada frasco continha uma alíquota de 50 ml de solução teste. Os frascos foram deixados destapados, para que houvesse uma oxigenação constante dos meios de teste.

Neste teste, utilizou-se a mesma água que no teste anterior (água desclorinada) para se efectuar as diluições. Os testes foram mantidos nas mesmas condições ambiente que os lotes de cultura (fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuridão) e temperatura ambiente ($20\pm 1^\circ\text{C}$). Os organismos receberam uma alimentação diária, que correspondia a uma suspensão de fermento comercial previamente preparado por suspensão em água desclorinada. A quantidade de fermento suspensa em água foi definida numa razão de 4 g por 25 ml de água. Cada grupo de 4 organismos era alimentado com uma gota deste preparado por dia.

Os organismos foram acompanhados diariamente, com observações diárias do seu estado. Após o período de 10 dias aproximadamente, foram iniciadas as contagens do número de neonatos gerados por fêmea, duas vezes por semana. O meio foi renovado 3 vezes por semana, o que caracteriza um teste semi-estático. Em cada substituição de alíquota, os neonatos foram retirados e contabilizados. Este procedimento impedia que os metabolitos alterassem a qualidade do meio, diminuindo assim possíveis interferências, e impediram a competição entre as progenitoras e os neonatos pelo alimento.

IV.7. **Análise estatística**

Os critérios indicativos de toxicidade em *D. magna* variaram consoante os testes realizados. Nos testes realizados com neonatos o critério utilizado foi a sobrevivência; nos testes envolvendo a reprodução, o parâmetro adoptado foi o número de neonatos vivos por adulto. A existência de diferenças significativas entre as várias concentrações de elutriado relativamente ao controlo, foi avaliada através de uma análise de variância (ANOVA) unifactorial. No sentido de discriminar as potenciais diferenças dos tratamentos em relação aos controlos, foi utilizado o teste de Dunnett.

V. Resultados

V.1. Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda não revelou mortalidade. O número de animais sobreviventes foi similar em todos os tratamentos, no final do teste, pelo que se pode concluir sobre a ausência de toxicidade das diversas diluições dos elutriados dos solos das diferentes proveniências.

Tabela 5 - Resultados do teste de toxicidade aguda, respectivo a duas réplicas (expresso em número de animais mortos por diluição)

	Diluições			
	25%	50%	75%	100%
Sem pesticida	0	0	0	0
Pesticida ano passado	0	0	1	2
Pesticida este ano	0	0,5	0	0

V.2. Teste de toxicidade crónica

Após a análise comparativa das diversas ninhadas (4, no total), nascidas em diversas diluições dos diferentes elutriados, foi possível constatar diferenças significativas importantes.

Solo no qual não houve aplicação de pesticida

Assim, a 4ª ninhada nascida a partir de elutriado de solo sem pesticida revelou ser significativamente diferente em relação ao controlo, nas diluições de 50 e de 100%. Nas restantes ninhadas não houve diferenças significativas entre os animais controlo e os expostos às diluições de elutriado. O número de neonatos nascidos na 1ª, 2ª e 3ª ninhadas não foram diferentes entre as concentrações testadas e o controlo.

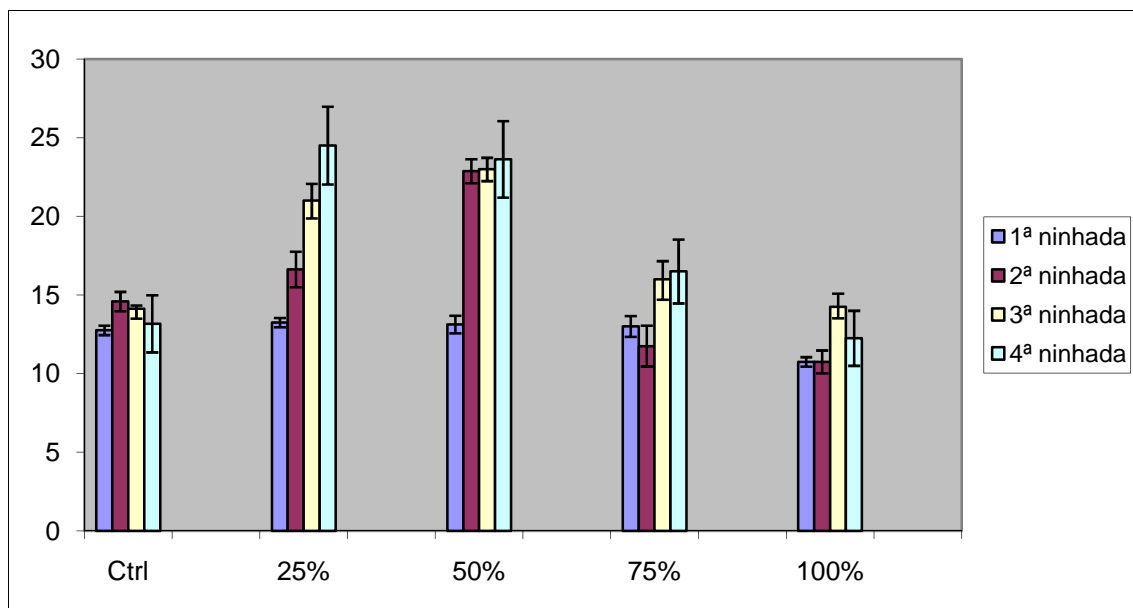


Gráfico 2 - Número médio de neonatos produzidos por *Daphnia magna* num elutriado tratado sem pesticida

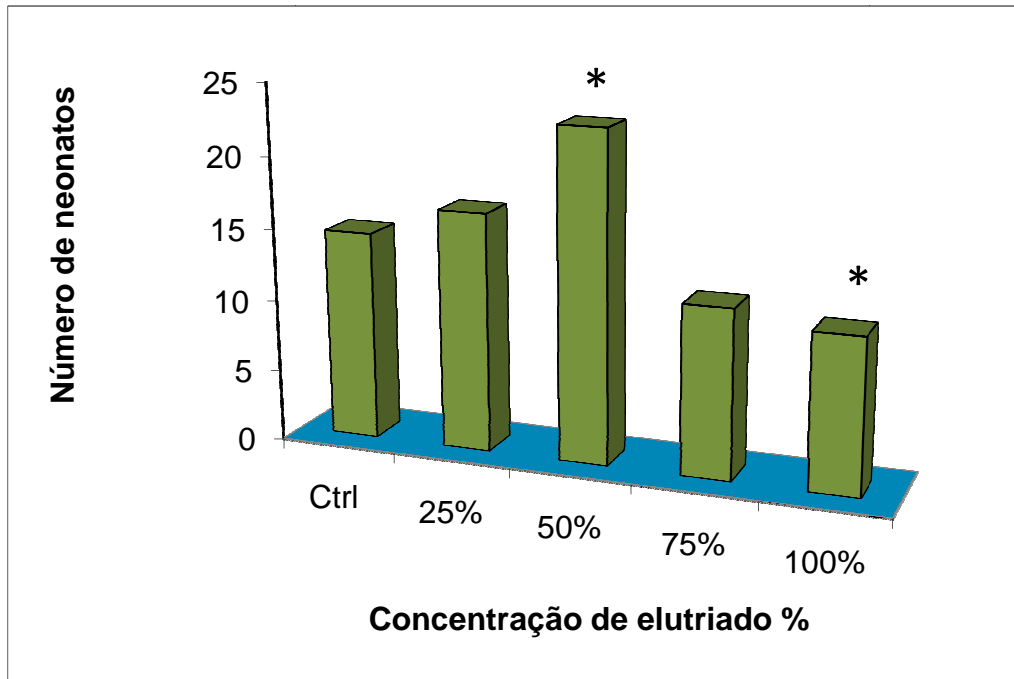


Gráfico 3 - Número médio de neonatos produzidos por *Daphnia magna* à 4ª ninhada num elutriado sem pesticida (* - diferenças significativas, $p < 0,05$) (teste de Dunnet).

No gráfico 3 verifica-se uma variação significativa na concentração de 50% de elutriado em que a média de neonatos nascidos por *Daphnia magna* é de 22.87, enquanto na concentração de 100% é de 10.75, o que significa que é inferior ao controlo (14.58), (g.l.: 4, 5; $F = 49,4$; $p < 0,05$).

Solo no qual o pesticida foi aplicado no ano anterior

De modo similar, a 3ª ninhada nascida em elutriado de solo em que o pesticida foi aplicado no ano transacto, apresentou diferenças significativas em relação aos animais controlo: todos os animais expostos a todas as diluições tiveram um número significativamente superior de filhotes (g.l.: 4, 5; $F = 9,21$; $p < 0,05$).

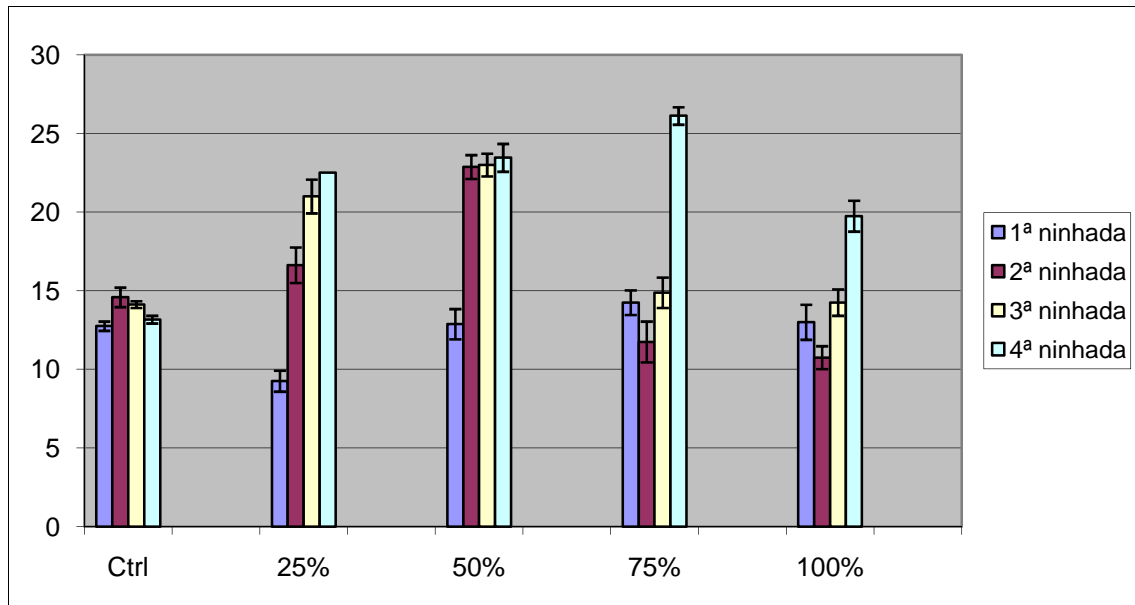


Gráfico 4 - Número médio de neonatos produzidos por *Daphnia magna* num elutriado tratado com pesticida no ano transacto.

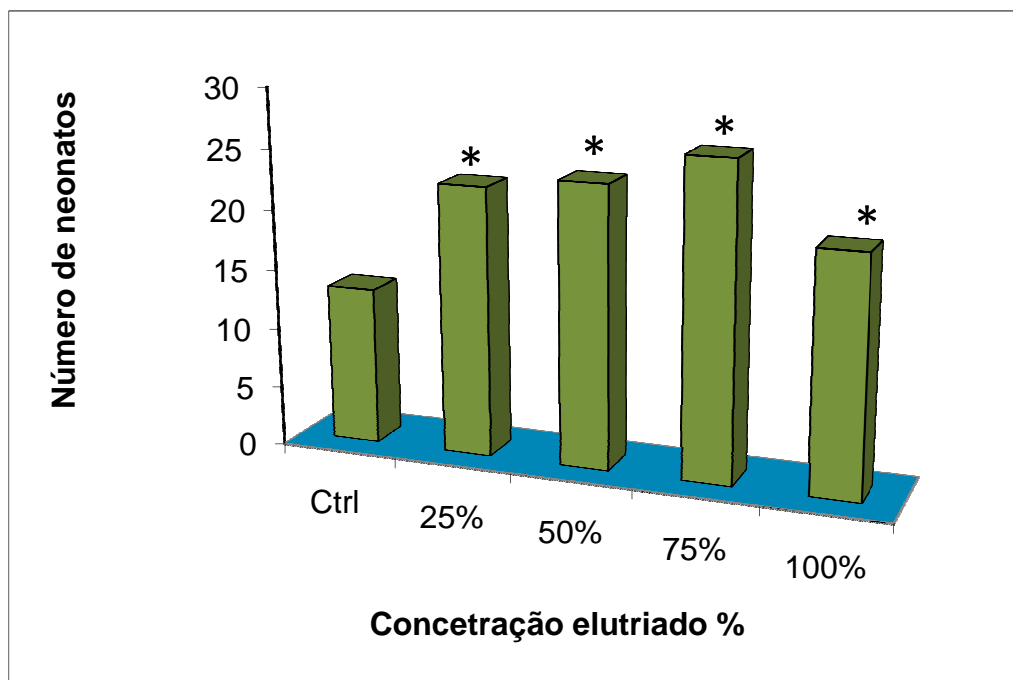


Gráfico 5 - Número médio de neonatos produzidos por *Daphnia magna* num elutriado respectivo à 4ª ninhada com pesticida do ano transacto (* - diferenças significativas, $p < 0,05$) (teste de Dunnet).

No gráfico 4 observa-se um aumento gradual da média do número de neonatos por *Daphnia magna* respectivamente, a 25% (22,5); 50% (23,45); 75% (26,1), diminuindo na concentração 100% para 19,75.

Solo no qual o pesticida foi aplicado este ano

Os elutriados de solo no qual o pesticida foi aplicado no presente ano não foram responsáveis por qualquer alteração significativa na produção de neonatos de *Daphnia magna*, para qualquer das diluições testadas. Pois à 1ª ninhada obteve-se (g.l.: 4, 5; F = 7.80; $p > 0.5$), 2ª ninhada (g.l.: 4, 5; F = 6.53; $p > 0.5$), 3ª ninhada (g.l.: 4, 5; F = 1.66; $p > 0.5$) e à 4ª ninhada (g.l.: 4, 5; F = 24.99; $p > 0.50$).

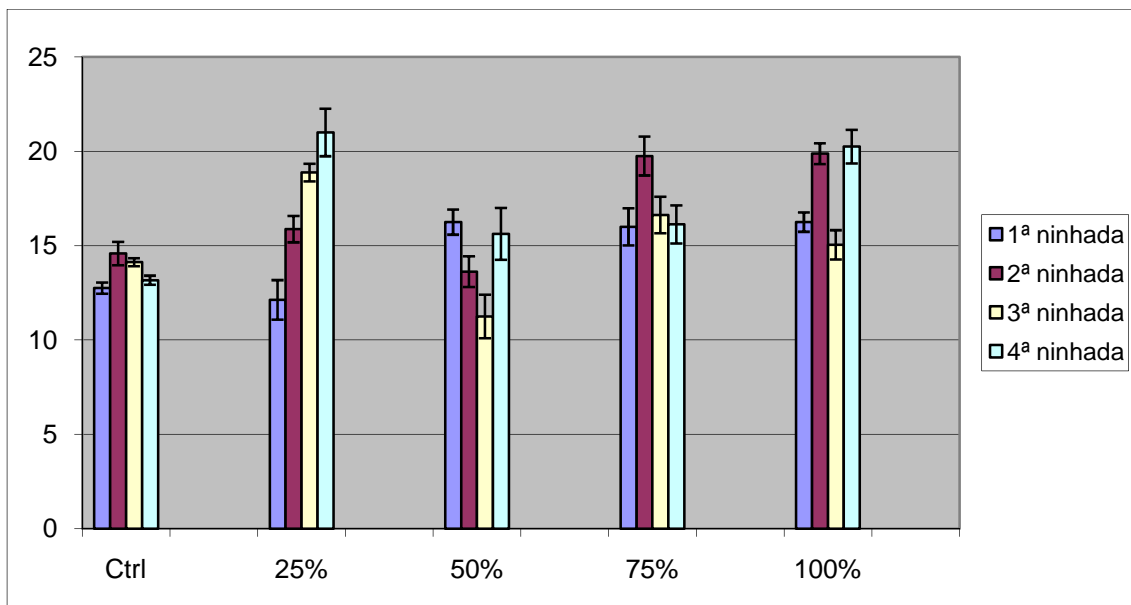


Gráfico 6 - Número médio de neonatos produzidos por *Daphnia magna* num elutriado tratado com pesticida no momento da colheita.

VI. Discussão

VI.1. Efeitos agudos

Durante os ensaios de toxicidade aguda, realizado por exposição dos organismos durante 24 horas (tabela 5) podemos verificar que não existe qualquer diferença estatística entre o solo sem pesticida, o solo com pesticida aplicado antes da recolha da amostra e o solo no qual a aplicação ocorreu no ano anterior, em relação aos tratamentos controlo. Pode-se dizer que neste ensaio não existiu qualquer toxicidade, o que se pode ter ficado a dever ao facto do elutriado não conter o pesticida em quantidade suficiente para provocar efeito. De acordo com Bowyer et al. (1991) o resultado aqui obtido não será surpreendente, visto o mecanismo de acção do pesticida atrazina assentar na inibição do transporte de electrões na fotossíntese e na inibição da divisão celular, processos bioquímicos presentes nas plantas e não nos crustáceos. Palma et al. (2008) afirmou que a atrazina não é tóxica para *Daphnia magna*, é apenas “nociva” (EC, 1996), em função dos seus resultados ($EC_{50_{48h}}=35.5\text{mg/l}$). Huijun et al. (2006) verificaram que a toxicidade do pesticida s-metalocloro, avaliada pelo seu $LC_{50_{24h}}$ era de 51.2 mg/l, sendo considerado pouco tóxico para a *Daphnia magna*. De acordo com o estudo de Graham et al. (1996), que visou o estudo do efeito ecotoxicológico do s-metalocloro, concluiu que os resíduos deste pesticida presentes na água de escorrência apresentaram-se em concentrações compreendidas entre 0.17-50.7 $\mu\text{g/l}$. A estas concentrações, não se observou toxicidade, pelo que estes dados são coincidentes com os nossos resultados de toxicidade aguda. Tendo em linha de conta que o pesticida esteve em contacto directo com as partículas do solo, pode ter sido adsorvido a compostos orgânicos (Spark, 2002), diminuindo a sua fracção disponível para ser absorvida. Sabendo que o comportamento alimentar dos organismos testes envolvem a filtração, e partindo do princípio que a preparação do elutriado envolveu um passo de filtração, tal pode explicar a aparente ausência de efeitos tóxicos.

A disponibilidade de alimento, entre outros factores de stress natural, é um facto conhecido por modular os efeitos dos pesticidas em cladóceros (Pereira et al, 2006). O comprometimento do comportamento alimentar (filtração do material particulado) ou a toxicidade indirecta que surge pela incorporação do tóxico no alimento, são exemplos

de mecanismos que se encontram por trás da interacção alimentação-pesticida (Pereira, et al. 2006).

VI.2. Efeitos crónicos

De acordo com os resultados obtidos na exposição crónica do organismo teste *Daphnia magna* às diversas diluições do elutriado correspondente ao solo sem pesticida, pode observar-se que a média de neonatos produzido por fêmea variou na segunda, terceira e quarta ninhadas. Pelo contrário, não se verificaram alterações na primeira ninhada. Pode-se dizer que à quarta ninhada existiram alterações significativas entre os tratamentos de 50% e 100% e o controlo. O número de neonatos aumenta numa concentração de 50% para valores superiores ao controlo, e volta a diminuir para valores inferiores ao controlo numa concentração de elutriado de 100%. Verificou-se assim um efeito estimulatório na produção de neonatos por progenitora por análise do gráfico 3, que é comum quando testamos efluentes (Sibley, et al. 1997). De acordo com este estudo, o efeito estimulatório na reprodução de *Daphnia magna* pode ser provocado pela alta concentração em nutrientes e bactérias, podendo mascarar os efeitos dos contaminantes a baixas concentrações. Organismos do género *Daphnia* investem selectivamente nos processos fisiológicos centrais (reprodução, crescimento, manutenção e eventualmente armazenamento) respeitando um equilíbrio dinâmico cujo fim é assegurar a longevidade e a consequente capacidade reprodutiva a longo termo (Kooijman, 1986; McCauley et al. 1990; Polishchuk & Vijverberg, 2005, Rinke & Vijverberg, 2005).

Na exposição do organismo ao elutriado de solo no qual não houve aplicação de qualquer pesticida, acontece que na concentração de 100% as progenitoras diminuíram a sua taxa reprodutiva para valores inferiores ao controlo; o mesmo não acontece com o elutriado de solo com pesticida do ano transacto, pois aqui verifica-se que a taxa reprodutiva é superior à do tratamento controlo.

O número de neonatos produzidos na 4ª ninhada por fêmeas *Daphnia magna* quando expostas a elutriado com pesticida do ano transacto, foi significativamente mais elevada do que o controlo para todas as diluições. Ocorreu assim um aumento gradual na taxa

reprodutiva entre a concentração 25% e 75% e uma diminuição do número de neonatos na concentração 100%, embora os valores de reprodução sejam superiores ao controlo. Segundo Calabrese e Baldwin (1998) quando a *Daphnia magna* é exposta a uma baixa quantidade de tóxico, este aumento de neonatos a baixas concentrações de elutriado e consequente diminuição a altas concentrações pode resultar de um efeito hormético. Este resultado é característico de um fenómeno denominado como Hormese em que existe uma relação (dose/resposta), que produz um efeito estimulatório a baixas doses (30-60% superior ao controlo) e inibição a altas doses (Masoro, 2000; Chapman, 2001; Calabrese e Baldwin, 2001). Organismos da espécie *Daphnia magna* quando sujeitos a baixas concentrações de elutriado contaminado, são estimulados a produzir maior número de neonatos, em resposta à perturbação ambiental, com o objectivo de assegurar a continuidade da espécie; no entanto, maior concentração de contaminante origina toxicidade, pelo que a reprodução sofre inibição. O efeito hormético pode ser observado em todos os grupos de organismos como bactérias e fungos, plantas superiores e animais (Calabrese, 2005).

No presente estudo verificou-se uma diferença na taxa reprodutiva nos tratamentos 100%, dos elutriados sem qualquer pesticida e com pesticida do ano transacto. No elutriado de solo sem pesticida a taxa reprodutiva baixou para valores próximos do controlo (admite-se não haver toxicidade), enquanto que, no elutriado do ano transacto a taxa reprodutiva no tratamento 100% baixou para valores superiores ao controlo (aproximadamente 60% superior), o que nos leva ao fenómeno de Hormese que é evidenciado no tratamento 100%.

A persistência do pesticida s-metalocloro no solo é de 37 dias (Kollman e Segawa, 2000) e da atrazina de 60 dias (Wauchope et al., 1992). O pesticida s-metalocloro pode ser degradado a metolacoloro etano ácido sulfónico (ESA) e metolacoloro ácido oxanílico (OA); por sua vez, estes compostos podem persistir em solos agrícolas por 3 ou mais anos após aplicação. O mesmo acontece com as triazinas (atrazina), pois estes derivados são encontrados em muitas águas de superfície, como foi o caso do Iowa Oriental, onde os derivados de pesticidas correspondiam a 93% da concentração total de pesticidas (Eckhardt et al., 1999; Kalkhoff e Thurman, 1999). De acordo com a persistência dos compostos em estudos anteriores, pode-se dizer que os resultados obtidos no nosso

estudo justificam a presença dos derivados dos pesticidas no elutriado. No tratamento de solo com pesticida do ano transacto, verificaram-se sinais de toxicidade, enquanto no tratamento que continha pesticida do presente ano não se obteve qualquer sinal indicativo de toxicidade.

Huijun et al. (2006) realizaram a avaliação dos efeitos crónicos de s-metalocloro em *Daphnia magna*. Constataram que uma concentração entre os 10 mg/l e 15 mg/l causava mortalidade total antes dos 18 dias. No mesmo estudo foi observado um decréscimo no número de neonatos por fêmea quando a concentração do pesticida era superior a 0,1 mg/L. A atrazina influencia a diminuição da reprodução de *Daphnia magna* pois segundo o estudo de Palma et al. (2009), a taxa de reprodução desta espécie baixou 46% para uma concentração de 0,5 mg/l. Diversos autores apontam no sentido de que a atrazina actua na fecundidade, diminuindo o número de juvenis, e o crescimento (Kaushik et al., 1985; Dodson et al., 1999). A atrazina induz a produção de hemoglobina na *Daphnia magna* através da sinalização da hormona terpenóide (Rider, et al., 2005). A produção de hemoglobina pode ter consequências ao nível da velocidade de consumo de oxigénio dissolvido no meio. Rider e LeBlanc (2006) verificaram que animais (*D. magna*) expostos a atrazina consumiam mais rapidamente o oxigénio dissolvido presente no meio, conduzindo à sua mais rápida depleção. Tal facto deve-se à maior necessidade energética da *D. magna* quando exposta ao tóxico. Este facto pode influenciar a reprodução da *D. magna*, pois esta entra em stress e produz menos neonatos, concentrando a energia na sobrevivência, em questões fisiológicas para a manutenção da longevidade.

Nos testes de toxicidade verificou-se variabilidade dos efeitos entre os testes realizados, o teste de toxicidade aguda não apresentou efeitos significativos em nenhum dos tratamentos avaliados. Já o teste de toxicidade crónica revelou resultados de toxicidade no elutriado correspondente ao tratamento do ano transacto à aplicação do pesticida, nomeadamente, um aumento da reprodução da *Daphnia magna* à 4ª ninhada.

Os nossos resultados permitem verificar que, embora a aplicação do pesticida seja feita de acordo com o folheto informativo do pesticida, pode causar alguns impactos, especificamente na reprodução dos organismos. Apesar de não serem detectados efeitos

letais nos organismos *Daphnia magna*, podem contudo manifestar-se na descendência, que pode ser afectada durante várias gerações. Finkler (2002) observou que, no teste de toxicidade crónica quando testava um percolado tratado sem coloração, verificou um aumento da taxa reprodutiva com consequente redução da longevidade e tamanho corpóreo dos neonatos de *D. magna*. Pesquisas em ecologia aquática têm enfatizado o zooplâncton como o elo vital nas cadeias alimentares, transferindo massa e energia de um nível trófico a outro (Lehman, 1991). Se existir uma diminuição populacional no zooplâncton, ao qual pertence a *Daphnia magna*, este vai afectar os níveis superiores, afectando toda a comunidade biótica.

VII. Conclusão

Este trabalho teve como objectivo avaliar os efeitos de potenciais lixiviados de solos agrícolas, nos quais foi aplicada uma formulação comercial de pesticidas contendo atrazina e S-metalocloro (Primestra Gold S®).

A avaliação do risco ecotoxicológico desta formulação comercial, de acordo com os resultados de toxicidade aguda, permitiu concluir que esta formulação não evidenciou toxicidade para o crustáceo de água doce *Daphnia magna* quando aplicado nas doses recomendadas. Já o teste de toxicidade crónica revelou resultados de toxicidade no elutriado correspondente ao elutriado do ano transacto à aplicação do pesticida.

Posto isto, mais estudos são necessários para verificar a toxicidade desta mistura de pesticidas. No entanto, pode concluir-se acerca da validade da metodologia usada para avaliar os efeitos da mistura, após um período longo. Elutriados de solos nos quais a aplicação foi efectuada há mais de um ano exibiram capacidade de alterar significativamente os padrões reprodutivos de *Daphnia magna*.

VIII. Bibliografia

Amaro, P. (2007). Pesticidas, Saúde e Ambiente e os tabus dos pesticidas em Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, 30 (1), pp. 201-216.

Amorim, L. C. (2003). Os biomarcadores e a sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 6 (2), pp. 159-170.

Anderson A. (1986). It's raining pesticides in Hokkaido. *Nature*, 320, p. 478

ANIPLA (Associação Nacional da Indústria para a Protecção das Plantas). (2009). Vendas de produtos fitofarmacêuticos. *Comunicado de Imprensa*. [Em linha]. Disponível em: <http://www.agroportal.pt/x/agronoticias/2009/01/31.htm>. [Consultado em 06/12/2009].

Augusto, T. C. (2004). *Estudo da aplicação da extracção supercrítica á remoção de pesticidas de solos contaminados*. Tese de Mestrado. Porto. Faculdade de engenharia da Universidade do Porto. 162pp.

Baird, C. (2002). *Química Ambiental. Parte II - Produtos Orgânicos Tóxicos*. 2ª edição Porto Alegre, Bookman.

Barroso, M. F. (2009). Efeitos Ecotoxicológicos de pesticidas e factores abióticos em *Daphnia magna*. Dissertação de Mestrado. Porto. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

Batista, S. (2003). *Exposição da água subterrânea a pesticidas e nitratos em ecossistemas agrícolas do Ribatejo oeste e da Beira Litoral*. Dissertação de Doutoramento. Lisboa. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia. 469 pp.

Brentano, D. M. (2006). *Desenvolvimento e Aplicação do Teste de Toxicidade crônica com daphnia magna: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário*. Dissertação de Mestrado. Florianópolis. Engenharia Ambiental. 145pp.

Bowyer J.R., Gamilleri, P. e Vermaas, W.F.J. (1991). Photosystem II and interaction with herbicides. In: Baker NR, Percival MP. *Herbicides*, 10. Elsevier, Amsterdam, pp. 27–85.

Bridges, T., Soares, A., Girling, A., Bradley, M. e Callow, P. (1996). Chronic toxicity of Great Lakes sediments to Daphnia: elutriate effects on survival, reproduction and population growth. *Ecotoxicology*, 5, pp. 83-102.

Calabrese, E. J. (2005). Paradigm lost, paradigm found: The reemergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environment. Pollution*, 138 (3), pp. 378-411.

Calabrese, E. e Baldwin, L. (1998). Hormensis as a biological hypothesis. *Environment Health Perspective*, 106(1) , pp. 357-362.

Calabrese, E. e Baldwin, L (2001). Hormensis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in Pharmacology Science*, 22(6), p.285-291.

C. E. (Comunidade Europeia). (2001). Decisão N.º 2455/2001/CE do parlamento europeu e do conselho de 20 de Novembro de 2001 que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Directiva 2000/60/CE. *Jornal Oficial das comunidades Europeias*, pp 4-5.

Chapman, P.M. (2001). The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment (ERA). *Human and experimental toxicology*, 20 (10) , pp. 2-9.

Dewailly, E., Ayotte, P., Bruneau, S., Laliberté, C., Muir, D., e Norstrom, R. (1993). Inuit exposure to organochlorines through the aquatic food chain in Arctic Quebec. *Environment Health Perspective*, 101, pp. 618-620.

DGAR (Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural) (2008). Actualização dos produtos fitofarmacêuticos aconselhados em protecção integrada. [Em linha] Disponível em : http://www.drapal.min-agricultura.pt/prod_fitofarmaceuticos/1_act.%20_milho-2008_FINAL.pdf. [Consultado em 02/01/2010]

Dodson, S., Merrit, C., Shannahan, J., e Shults, C. (1999). Low exposure concentrations of atrazine increase male production in *Daphnia pulicaria*. *Environment Toxicology and Chemistry* 18 (7). pp. 1568-1573.

EC (European Community). (1996). Technical guidance documents in support of directive 93/67/EEC on risk assessment of new notified substances and regulation (EC) N81488/94 on risk assessment of existing substances (parts I, II, III and IV). Off J Eur Commun.

Eckhardt, David A.V., William M. Kappel, William F. Coon, and Patrick J. Phillips. (1999). *Herbicides and their metabolism in Cayuga Lake and its tributaries, New York. U.S. Geological Survey Toxic Substances Hydrology Program—Proceedings of the Technical Meeting Charleston South Carolina March 8-12, Contamination of hydrologic systems and related ecosystems. Water-Resources Investigation Report, 2, pp. 99-4018.*

EPA (Environmental protection agency) (2009). [Em linha] Disponível em : <http://www.epa.gov/opp00001/health/cancerfs.htm#a>. [Consultado em 17/06/2009].

FINKLER, R. (2002). Avaliação do efeito tóxico de líquidos percolados sobre o sistema reprodutivo de *Daphnia magna*. Dissertação de Mestrado. Florianópolis. Engenharia Ambiental. 105p.

Geyer, H., Rimkus, G., Scheunert, I., Kaune, A., Schramm, K., Kettrup, A., et al. (2000). Bioaccumulation and Occurrence of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs), Persistent Organic Pollutants (POPs), and Other Organic Compounds in Fish and Other Organisms Including Humans. In Springer Berlin/Heidelberg, *The Handbook of Environmental Chemistry*, 2, Pag. 1-166

Giulio, R. T. e Hinton, D. E. (2008). *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press.

Graham, K.N., Sarna, L.P., Webster, G.R.B., Gaynor, J.D. e Ng, H.Y.F., (1996). Solid-phase microextraction of the herbicide metolachlor in runoff and tile-drainage water samples. *Journal of Chromatography*, 725 (1), pp. 129–136.

Graff, J.M. (1989); “Solos contaminados. Problemas e soluções na República Federal da Alemanha”, Dossier/Gestão de Resíduos.

Gish, T.J., e Rawls, W.J. (1998). Impact of Roots on GroundWater Quality. *Plant and Soil*, 200 (1), pp. 47-54.

Hamilton, D. e Crossley, S. (2004). *Pesticide Residues in Food and Drinking Water*. England. Jonh Wiley & Sons, Ltd.

Hodgson, O., Mailman, R.B., Chambers, J.E., e Dow, R.E. (1998). *Dictionary of Toxicology*., New York. MacMillan. 504 pp.

Huijun L., Weihong Y., Xiuming Z. e Weiping L., (2006). A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63 (3), pp. 451-455.

Kalkhoff, S.J., e Thurman, E.M. (1999). The occurrence of chloroacetanilide and triazine herbicide metabolites in streams in Eastern Iowa. Abstracts of the Seventh Symposium on the Chemistry and Fate of Modern Pesticides, Lawrence, KS. pp14-16.

Kaushik, N., Solomon, R., Stephenson, G., e Day, K. (1985). Assessment of sublethal effects of atrazine on zooplankton. *Canadian Technical Report Fisheries and Aquatic Sciences* , Pag. 377-379.

Kollman, W. e Segawa, R. (2000). Pest Chemistry Database. Environmental Hazards Assessment Program. California Department of Pesticide Regulation. Sacramento, CA.

Kooijman S. (1986). Population dynamics on the basis of budgets. In Johan A.J. Metz. & O Diekman (eds.), *The Dynamics of physiologically structured populations*. Springer / Berlin, pp. 266-297.

Lehman, J.T. (1991). Interacting growth and loss rates: The balance of top-down and bottom-up controls in plankton communities. *Limnology and Oceanography*, 36 (8), pp. 1546-1554.

Masoro, E.J. (2000). Dietary restriction and longevity extension as a manifestation of hormesis. *Human and Ecological Risk Assessment*, 6 (2), pp. 273-279.

McCauley E., Murdoch W.W., Nisbet R.M. e Gurney W.S.C. (1990). The physiological ecology of *Daphnia*: development of a model of growth and reproduction. *Ecology*, 71 (2) pp 703-715.

Mathews, G. A. (2006). *Pesticides: Health, Safety and the Environment*. Oxford. Blackwell Publishing Ltd.

NM. (2009). Agricultura: Comissão Europeia proíbe comercialização de 70 pesticidas à venda na Europa desde 1993. *Jornal de Notícias* .

Nunes Vannucci, M. e Tajara, E. H. (1998). Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. *Revista de Saúde Pública*, 32 (4), pp. 372-383.

Nunes, V. (2006). *Avaliação da exposição de águas subterrâneas a pesticidas na zona vulnerável do Tejo*. Dissertação de Mestrado. Lisboa. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.

Oliveira, R., Lima, M. M., e Vieira, J. M. (2006). Desenvolvimento de um sistema de indicadores de qualidade de águas superficiais numa bacia hidrográfica. *8º Congresso da água*. Figueira da Foz.

Oliver, B., e Niimi, A. (1998). Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. *Environmental Science and Technology* , 22, pp. 388-397.

Palma, P., Palma, V., Matos, C., Fernandes, R., Bohn, A., Soares, A., et al. (2009). Assessment of the pesticides atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos for juvenoid-related endocrine activity using *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 76 (3) , pp. 335-340.

Palma, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Soares, A. M. e Barbosa, I. R. (2008). Acute Toxicity of Atrazine, Endosulfan Sulphate and Chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, Relative to Their Concentrations in Surface Waters from the Alentejo Region of Portugal. *Bull Environment Contamination Toxicology* , 81 (5), pp. 485-489.

Pereira, J. L., Mendes, C. D. e Gonçalves, F. (2006). Short- and long term responses of *daphnia* spp. to propanil exposures distinct food supply scenarios. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 68 (3), pp. 386-396.

Pereira, T. (2003). *Impacte da utilização de pesticidas em ecossistemas orizícolas sobre a qualidade de águas superficiais*. Dissertação de Doutoramento. Lisboa. ISA/UTL.

Peixoto, M. J.(2008). *Qualidade Biológica da Água do Rio Cávado*. Dissertação de Mestrado. Porto. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 124pp.

Picado, A., Chankova, S., Fernandes, A., Simões, F., Leverett, D., Johnson, I., et al. (2007). Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67 (3), pp. 406-410.

Picanço, T. D. (2007). Caracterização da macrofauna bentónica do sapal do rio minho, Portugal. Dissertação de Mestrado. Porto. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

Pretty, J. (2005). *The Pesticide Detox*. Londres: Earthscan.

Polishchuk L.V., Vijverberg J. (2005). Contribution analysis of body mass dynamics in *Daphnia*. *Oecologia* 144 (2) pp. 268-277.

Rider, C. V. e LeBlanc, G. A. (2006). Atrazine stimulates hemoglobin accumulation in *Daphnia Magna*: Is it Hormonal or Hypoxic. *Toxicological sciences*, 93 (2), pp. 443-449.

Rider, C., Gorr, T., Olmstead, A. W., Wasilak, B., & LeBlanc, G. (2005). Stress signaling: Co-regulation of hemoglobin and male sex determination through a terpenoid signaling pathway in a crustacean. *Journal of Experimental Biology*, 208, pp. 15-23.

Rinke, K. e Vijverberg, J. (2005). A model approach to evaluate the effect of temperature and food concentration on individual life-history and population dynamics of *Daphnia*. *Ecological Modelling*, 186 pp. 326-344.

Rocha, A. R. (2001). Estudo da dinâmica espácio-temporal da comunidade de Macroinvertebrados bentónicos do rio Âncora. Dissertação de Mestrado. Porto. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Mickelson, S.K., P. B. (2001). Tillage and herbicide incorporation effects on residue cover, runoff, erosion, and herbicide loss. *Soil & Tillage Research*, 60 (1-2), pp. 55-66.

Sibley, P., Legler, J., Dixon, D., & Barton, D. (1997). Environmental health assessment of the benthic habitat adjacent to the pulp mill discharge. Acute and chronic toxicity of sediments to benthic macroinvertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32 (3) , pp. 274-284.

Silva, J. M. e Santos, J. R. (2007). Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 11 (4), pp. 565-573.

Simões, J. S. (2005). *Utilização de Produtos Fitofarmacêuticos na Agricultura*. 1ª edição. Porto. Sociedade Portuguesa de Inovação.

Simeonov, V., Stratis, J.A., Samara, C., Zachariadis, G., Voutsas, D., Anthemidis, A., Sofoniou, M. e Kouimtzis, T.. (2003). Assessment of the Surface Water Quality in Northern Greece. *Water Research*, 37 (17), pp. 4119-4124.

Smith, V. R. (1993). "Groundwater Contamination by Triazine Herbicides". Levels Plain, South Canterbury, Report R93 (36), Canterbury Regional Council, Christchurch. 36.

Snedeker M., S. (2001). Pesticide and Breast Cancer Risk: A Review of DDT, DDE, Dieldrin. *Environmental Health Perspectives*, 109, pp. 35-47.

Spadotto, C.A. (2002). "Comportamento e destino Ambiental de Herbicidas", *Comité de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas*.

Spark, K. M. e Swift R. S. (2002). Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *The Science of The Total Environment*, 298, (1-3), pp 147-161.

Stenersen, J. (2004). *Chemical Pesticides - Mode of action and toxicology*. Florida, CRC Press.

Stringhini, F. e Salomon, P. (2004) *Implantação de testes ecotoxicológicos com o microcrustáceo Daphnia magna no Laboratório de Engenharia Ambiental*. Projecto Individual. Brasil. Universidade do Sul de Santa Catarina. Curso de Engenharia Ambiental

Vieira, J. S. (2007). *Transformações Biogeoquímicas na Bacia Hidrográfica do Rio Lis*. Dissertação de Doutoramento. Porto. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Vieira, M. M. (2005). *Vendas de produtos fitofarmacêuticos em Portugal em 2005*. Lisboa.

WATECO, e CE. (2003). *Metodologia de aplicação da directiva quadro da água*. Lisboa, Instituto da Água, Ministério das Cidades, Ordenamento do Território e Ambiente .

Wauchope, R.D., Butler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn-Beckers, P.W.M., e Burt, J.P. (1992). The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision making. *Reviews of Environmental Contamination Toxicology*, 123, pp. 1-155.

Waxman, M. F. (1998). *Handbook of Pesticides*. Boca Raton. CRC Press LLC.

WBCSD (World Business Council for Sustainable Development). (2006). *Facts and trends water*. [Em linha]. Disponível em: <http://www.wbcd.org>. [Consultado em 18/03/2010].

WHO. (1990). *Public health impacts of pesticides used in agriculture*. Genebra, World Health Organization. [Em linha]. Disponível em: <http://www.who.int/en/> [Consultado em 18/03/2010].

Williams, P. L., James, R. C. e Roberts, S. M. (2000). *Principles of Toxicology Environmental and industrial applications*. Canada, John Wiley & Sons, Inc.

IX. Anexos

IX.1. Anexo 1 adaptado de CE (2001)

L 331/4

PT

Jornal Oficial das Comunidades Europeias

15.12.2001

ANEXO

«ANEXO X

LISTA DAS SUBSTÂNCIAS PRIORITÁRIAS NO DOMÍNIO DA POLÍTICA DA ÁGUA (*)

	Número CAS (1)	Número UE (2)	Designação da substância prioritária	Identificada como substância perigosa prioritária
(1)	15972-60-8	240-110-8	Alachloro	
(2)	120-12-7	204-371-1	Ántraceno	(X) (***)
(3)	1912-24-9	217-617-8	Atrazina	(X) (***)
(4)	71-43-2	200-753-7	Benzeno	
(5)	não aplicável	não aplicável	Éteres difenólicos bromados (**)	X (****)
(6)	7440-43-9	231-152-8	Cádmio e compostos de cádmio	X
(7)	85535-84-8	287-476-5	C ₁₀₋₁₃ -cloroalquenos (**)	X
(8)	470-90-6	207-432-0	Clorfeninfos	
(9)	2921-88-2	220-864-4	Clorpirifos	(X) (***)
(10)	107-06-2	203-458-1	1,2-Dicloroetano	
(11)	75-09-2	200-838-9	Diclorometano	
(12)	117-81-7	204-211-0	Di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)	(X) (***)
(13)	330-54-1	206-354-4	Diuron	(X) (***)
(14)	115-29-7	204-079-4	Endossulfão	(X) (***)
	959-98-8	não aplicável	(alfa-endossulfano)	
(15)	206-44-0	205-912-4	(Fluoranteno) (*****)	
(16)	118-74-1	204-273-9	Hexaclorbenzeno	X
(17)	87-68-3	201-765-5	Hexaclorbutadieno	X
(18)	608-73-1	210-158-9	Hexaclorciclohexano	X
	58-89-9	200-401-2	(isómero gama, Lindano)	
(19)	34123-59-6	251-835-4	Isoproturon	(X) (***)
(20)	7439-92-1	231-100-4	Chumbo e composto de chumbo	(X) (***)
(21)	7439-97-6	231-106-7	Mercúrio e composto de mercúrio	X
(22)	91-20-3	202-049-5	Naftaleno	(X) (***)
(23)	7440-02-0	231-111-4	Níquel e composto de níquel	

	Número CAS (1)	Número UE (2)	Designação da substância prioritária	Identificada como substância perigosa prioritária
(24)	25154-52-3	246-672-0	Nonilfenóis	X
	104-40-5	203-199-4	(4-(para)-nonilfenol)	
(25)	1806-26-4	217-302-5	Octilfenóis	(X) (***)
	140-66-9	não aplicável	(para-tert-octilfenol)	
(26)	608-93-5	210-172-5	Pentaclorbenzeno	X
(27)	87-86-5	201-778-6	Pentaclorfenol	(X) (***)
(28)	não aplicável	não aplicável	Hidrocarbonetos poliaromáticos	X
	50-32-8	200-028-5	(Benzo(a)pireno)	
	205-99-2	205-911-9	(Benzo(b)fluoranteno)	
	191-24-2	205-883-8	(Benzo(g,h,i)perileno)	
	207-08-9	205-916-6	(Benzo(k)fluoranteno)	
	193-39-5	205-893-2	(Indeno(1,2,3-cd)pireno)	
(29)	122-34-9	204-535-2	Simazina	(X) (***)
(30)	688-73-3	211-704-4	Composto de tributileno	X
	36643-28-4	não aplicável	(catião-tributileno)	
(31)	12002-48-1	234-413-4	Triclorobenzenos	(X) (***)
	120-82-1	204-428-0	(1,2,4-Triclorobenzeno)	
(32)	67-66-3	200-663-8	Triclorometano (Clorofórmio)	
(33)	1582-09-8	216-428-8	Trifluralina	(X) (***)

(*) Nos casos em que foram seleccionados grupos de substâncias, mencionam-se entre parêntesis representantes típicos individuais, como parâmetros indicativos (entre parêntesis e sem número). O estabelecimento de medidas de controlo será feito em função destas substâncias, sem prejuízo da eventual inclusão de outros representantes individuais, se for caso disso.

(**) Estes grupos de substâncias incluem em geral um grande número de compostos individuais. Não é actualmente possível apontar parâmetros indicativos adequados.

(***) Esta substância prioritária está sujeita a um exame para identificação como eventual "substância perigosa prioritária". A Comissão apresentará ao Parlamento Europeu e ao Conselho uma proposta para a sua classificação final num prazo não superior a 12 meses após a aprovação desta lista. Esta revisão não afectará o calendário estabelecido no artigo 16.º da Directiva 2000/50/CE para as propostas de controlos da Comissão.

(****) Apenas éter pentabromodifenílico (número CAS 32534-81-9).

(*****) O fluoranteno figura na lista como indicador de outros hidrocarbonetos mais perigosos.

(1) CAS: Chemical Abstract Services.

(2) Número UE: Inventário Europeu das substâncias químicas notificadas (ELINCS).

IX.2. Anexo 2 adaptado de Waxman (1998)

Pode-se diferenciar os herbicidas de acordo com os seguintes parâmetros:

- Tempo da aplicação e sementeira ou plantação
 - Pré-sementeira
 - Pre-emergente
 - Pro-emergente

- Área de aplicação
 - Herbicidas para Folhas
 - Herbicidas de solo

- Mecanismo de acção
 - Herbicidas de contacto
 - Herbicidas sistémicos

- Espectro
 - Não selectivos
 - Selectivos