UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Ciência da Engenharia Ambiental

ANA LETÍCIA MADEIRA SANCHES

Avaliação do efeito ambiental do inseticida Kraft 36EC[®] (abamectina) e do fungicida Score 250EC[®] (difenoconazol) por meio de análises ecotoxicológicas em diferentes estágios de vida do *Danio rerio*

São Carlos
Estado de São Paulo
2018

ANA LETÍCIA MADEIRA SANCHES

Avaliação do efeito ambiental do inseticida Kraft 36EC[®] (abamectina) e do fungicida Score 250EC[®] (difenoconazol) por meio de análises ecotoxicológicas em diferentes estágios de vida do *Danio rerio*

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), da Universidade de São Paulo (USP), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

São Carlos
Estado de São Paulo
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Madeira Sanches, Ana Letícia

M532a Avaliação do efeito ambiental do inseticida Kraft 36EC® (abamectina) e do fungicida Score 250EC® (difenoconazol) por meio de análises ecotoxicológicas em diferentes estágios de vida do *Danio rerio* / Ana Letícia Madeira Sanches; orientador Evaldo Luiz Gaeta Espíndola. São Carlos, 2018.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **ANA LETICIA MADEIRA SANCHES**.

Título da tese: "Avaliação do efeito ambiental do inseticida Kraft 36EC® (abamectina) e do fungicida Score 250EC® (difenoconazol) por meio de análises ecotoxicológicas em diferentes estágios de vida do *Danio Rerio*".

Data da defesa: 29/06/2018.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Evaldo Luiz Gaeta Espíndola**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Profa. Dra. **Marisa Narciso Fernandes**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Dra. **Juliane Silberschmidt Freitas**
(Pós-Doutoranda/FAPESP)

Aprovada

Dra. **Adrislaine da Silva Mansano Dornfeld**
(Pós-Doutoranda/FAPESP)

Aprovada

Dr. **Rhau de Oliveira**
(Pós-Doutorando/CAPES)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Associado **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

Ao meu mais novo amor que desde cedo, aqui de dentro da barriga,
me acompanhou nas emoções e ansiedades ao elaborar este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador e amigo, Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, pela confiança, dedicação, bons conselhos e momentos de trabalho e lazer inesquecíveis durante os quatro anos de convivência.

Agradeço ao pesquisador visitante e amigo, Michiel A. Daam, pela co-orientação desta pesquisa, bem como por toda ajuda e parceria nas publicações dos artigos.

Agradeço aos colegas e amigos do NEEA: Allan, Ana, André, Bruna, Clarice, Cláudia, Danilo, Diego, Edna, Emanuela, Emily, Gabriela, Janete, Juliane, Laís, Livia, Lucas, Maressa, Maria Paula, Marina, Mirian, Obede, Otiniel, Raquel, Renata, Tandy, Thiago e Vanessa, por toda ajuda, trabalho em equipe, pelas risadas e amizades verdadeiras que foram formadas durante nosso convívio.

Agradeço a todos os funcionários e técnicos da EESC/USP/São Carlos pelo suporte técnico e acadêmico.

Agradeço aos profissionais do CENA, da ESALQ/USP/Piracicaba, especialmente ao técnico de laboratório Rodrigo Pimpinato e ao Prof. Dr. Valdemar Tornisielo, pela oportunidade, parceria, aprendizado e análises químicas realizadas.

Agradeço à UNESP/São José do Rio Preto e aos amigos do LBCA pela parceria, especialmente ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, por possibilitar as análises dos biomarcadores.

Agradeço ao Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro - Portugal, especialmente à pesquisadora Dra. Inês Domingues pela orientação e oportunidade, à técnica e colega Rita pela ajuda, e aos amigos Aline, Raquel, Gabriela, Gilberto e Fernanda pela amizade e companhia durante meu estágio em Portugal.

Agradeço à minha família pela base, apoio incondicional e oportunidades que sempre me proporcionaram, apesar de todas as dificuldades e ao meu noivo Caetano pelo carinho, apoio, parceria, ajuda e paciência em todos os momentos.

Agradeço à Fapesp pelo apoio e financiamento da pesquisa tanto no país quanto no exterior (Processos 2014/14621-0 e 2017/05543-3), à CAPES pelo apoio financeiro inicial e ao CNPq (402392/2013-2) pelo financiamento do projeto geral.

RESUMO

SANCHES, A. L. M. (2018) Avaliação do efeito ambiental do inseticida Kraft 36EC® (abamectina) e do fungicida Score 250EC® (difenoconazol) por meio de análises ecotoxicológicas em diferentes estágios de vida do *Danio rerio*. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, EESC-USP. 172p.

O Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e o Score 250EC® (i.a. difenoconazol) são agrotóxicos intensamente utilizados nas culturas de morango em regiões de clima tropical, embora sejam compostos classificados como extremamente tóxicos e muito perigosos ao ambiente. Misturas de agrotóxicos são aplicadas nas culturas agrícolas e a presença destes compostos na água pode potencializar os efeitos tóxicos a organismos aquáticos não alvos. A ocorrência do escoamento superficial (*runoff*) contaminado com agrotóxico e a contaminação por aspersão direta (*spray drift*) em ecossistemas tropicais próximo aos corpos hídricos também podem comprometer o ecossistema aquático local devido à toxicidade desses compostos a organismos não alvos. Considerando os riscos ecológicos inerentes ao uso destes agrotóxicos, o objetivo principal desta pesquisa foi avaliar o efeito ambiental dos praguicidas Kraft 36EC® e Score 250EC® e de seus princípios ativos, abamectina e difenoconazol, respectivamente. Foram realizados testes de toxicidade aguda em laboratório a partir de exposições dos compostos isolados e em misturas utilizando como organismo teste embriões e adultos de *Danio rerio*. Experimentos *in situ* (mesocosmos) foram realizados a fim de avaliar os efeitos do *runoff* e *spray drift* contaminados com os agrotóxicos Kraft 36EC® e Score 250EC®, isolados e em misturas. Tanto nos mesocosmos quanto em experimentos de laboratório analisou-se, além da mortalidade, biomarcadores bioquímicos. Pelos resultados obtidos verifica-se que não foram observadas diferenças significativas entre a toxicidade isolada dos ingredientes ativos e suas respectivas formulações comerciais em testes agudos. Nos testes de toxicidade com as misturas dos ingredientes ativos, observou-se que a mistura de abamectina + difenoconazol promoveu um efeito tóxico sinérgico a adultos de *Danio rerio* em exposições agudas. Observou-se também a ausência do mesmo efeito nas exposições com as misturas das formulações comerciais neste mesmo estágio de vida. A exposição dos embriões às misturas de Kraft 36EC® e Score 250EC® mostrou um efeito antagônico nas baixas concentrações e efeito sinérgico nas mais altas. Verificou-se um aumento significativo na atividade da enzima de biotransformação 7-etóxiresorufina-0-deetilase (EROD) e nos níveis de malondialdeído MDA nas brânquias de peixes expostos à formulação comercial da abamectina. Houve um aumento na atividade da glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e níveis de MDA, e diminuição da glutathione redutase (GR) nas brânquias dos peixes expostos ao difenoconazol e sua formulação comercial. Também foi observado um aumento nas respostas dos biomarcadores analisados nas brânquias dos organismos expostos às misturas tanto dos princípios ativos quanto das formulações comerciais. A exposição ao Kraft 36EC® *spray drift* em campo promoveu os maiores efeitos deletérios no metabolismo de *Danio rerio*, seguido das exposições ao *runoff* contaminado com Kraft 36EC® e Score 250EC®. As formulações comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC® e as misturas das mesmas promoveram alterações significativas no metabolismo de detoxificação, e causam estresse oxidativo em peixes. Diferenças no padrão de respostas dos biomarcadores entre os experimentos realizados em mesocosmos e em laboratório ficam evidentes devido à influência das concentrações utilizadas, das interações ecológicas entre as comunidades presentes no meio e das variáveis ambientais nos experimentos em mesocosmos. A avaliação da toxicidade de agrotóxicos, especialmente em países tropicais, e indicações para futuras pesquisas são discutidos.

Palavras-chave: agrotóxicos, *zebrafish*, misturas, biomarcadores.

ABSTRACT

SANCHES, A. L. M. (2018) Analysis of the environmental effect of the insecticide Kraft 36EC® (abamectin) and the fungicide Score 250EC® (difenoconazole) by means of ecotoxicological analyzes in different *Danio rerio* life stages. Doctoral thesis. Postgraduate Program in Environmental Engineering Sciences, EESC-USP. 172p.

Kraft 36EC® (a.s. abamectin) and Score 250EC® (a.s. difenoconazole) are intensely used pesticides in strawberry crops in tropical regions, even though they are classified as extremely toxic and very dangerous to the environment. Mixtures of agrochemicals are applied to agricultural crops and the presence of these compounds in water may potentiate toxic effects to non-target aquatic organisms. The contamination of edge-of-field water bodies through runoff and spray drift may compromise the local aquatic ecosystem due to the toxicity of these compounds to non-target organisms. Considering the potential ecological risks related with the use of these pesticides, the main objective of this research was to evaluate the environmental effects of the pesticides Kraft 36EC® and Score 250EC® and its active ingredients abamectin and difenoconazole, respectively. Acute toxicity tests were performed in the laboratory with the isolated compounds and their mixtures using zebrafish (*Danio rerio*) embryos and adults as test organism. A mesocosm experiment was also performed to evaluate the effects of simulated runoff and spray drift containing Kraft 36EC® and Score 250EC® individually and in mixtures. Besides lethality, selected biomarkers were also evaluated in the fish from the mesocosm and laboratory experiments. No significant differences were observed in effects of the active ingredients and their respective commercial formulations in acute fish tests after single exposure to each test compound. The acute mixture toxicity tests with the active ingredients showed that this mixture exerts a synergistic toxic effect to adult fish. The absence of the synergistic effect on exposures with the commercial formulations mixtures was also observed. Embryo exposure to Kraft 36EC® and Score 250EC® mixtures showed an antagonistic effect at low concentrations and synergistic effect at the highest. A significant increase was observed in the activity of the EROD biotransformation enzyme and in the levels of MDA in fish gills after exposure to Kraft 36EC®. An increase in GST activity, GPx and MDA levels, and a decrease of GR in fish gills was noted after fish exposure to difenoconazole and its commercial formulation. An increase in the responses of the biomarkers analyzed in the gills of the organisms exposed to the mixtures of both the active ingredients and the commercial formulations as compared to single-compound exposure was also observed. Exposure to simulated spray drift of Kraft 36EC® in the mesocosms promotes the greatest deleterious effects on metabolism of *Danio rerio* followed by exposures to the runoff contaminated with a Kraft 36EC® and Score 250EC® mixture. The commercial formulations Kraft 36EC® and Score 250EC® and their mixtures lead to significant changes in the detoxification metabolism resulting in oxidative stress to fish. Differences in biomarkers responses between the experiments performed in the mesocosms and the laboratory were noted and are due to the different concentrations tested; the ecological interactions between the communities present in the mesocosms and differences in environmental variables. The need and indications for future research related with the evaluation of pesticide toxicity, especially in tropical countries, are discussed.

Key words: pesticides, zebrafish, mixtures, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. 1 - Figura mostrando o design experimental fatorial completo utilizado nos experimentos com adultos de <i>Danio rerio</i> expostos às misturas dos ingredientes ativos abamectina + difenoconazol (A) e formulações comerciais Kraft 36EC® + Score 250EC® (B)	31
Figura 1. 2 - Gráficos das CLx modeladas x CLx reais. À esquerda o efeito sinérgico na exposição de <i>Danio rerio</i> às misturas dos ingredientes ativos abamectina + difenoconazol e à direita os efeitos provocados pelas misturas dos produtos comerciais	39
Figura 1. 3 - Isoboles plotados pelas exposições de adultos de <i>Danio rerio</i> expostos às misturas dos princípios ativos abamectina + difenoconazol (esquerda) e das formulações comerciais Kraft36EC® + Score250EC® (direita).....	39

Capítulo 2

Figura 2. 1 - Principais estágios de vida da espécie <i>Danio rerio</i> : ovos, larva e organismo adultos.....	46
Figura 2. 2 - Desenvolvimento embrionário do <i>Danio rerio</i> durante o período de 0h após a fertilização até 72h em que ocorre a eclosão da larva jovem. Adaptado de Kimmel et al., 1995	50
Figura 2. 3 - Design experimental dos ensaios FET realizados nas exposições dos embriões expostos aos compostos Kraft 36EC® e ao Score 250EC® separadamente a fim de obter a CL ₅₀ de cada composto. C i = controle interno.....	51
Figura 2. 4 - Design experimental fatorial mostrando todas as combinações realizadas nas exposições dos embriões às misturas binárias de Kraft 36EC® e Score 250EC®	52
Figura 2. 5 - Design experimental do ensaio realizado com embriões de <i>Danio rerio</i> expostos as misturas binárias de Kraft 36EC® e Score 250EC®. No total foram realizados 36 tratamentos, com três placas para cada tratamento, contendo cinco ovos em cada placa (n=15).....	52
Figura 2. 6 – Gráfico dos batimentos cardíacos dos embriões de <i>Danio rerio</i> expostos ao Kraft 36EC® (esquerda) e ao Score 250EC® (direita) após 48h de exposição contados durante 20 segundos. * Diferenças significativas em relação ao controle	54
Figura 2. 7 - Fotos dos organismos do teste FET. A – Larva saudável de <i>Danio rerio</i> do controle 96h; B – Atraso na eclosão do ovo de <i>Danio rerio</i> exposto ao Kraft 36EC® após 96h de exposição; C – Edemas de pericárdio em embriões de <i>Danio rerio</i> expostos ao Kraft 36EC® após 96h de exposição; D – Atraso na eclosão do ovo e edemas em embrião de <i>Danio rerio</i> expostos ao Score 250EC® após 96h de exposição; E - Larva saudável de <i>Danio rerio</i> do controle 120h; F – Atraso na eclosão e edema em embrião de <i>Danio rerio</i> exposto ao Kraft 36EC® após 120h de exposição; G – Organismo morto após 120h de exposição ao Kraft 36EC®; H – Organismo morto após 120h de exposição ao Score 250EC®.....	55

Figura 2. 8 - Isoblograma dos efeitos das misturas dos pesticidas Kraft 36EC® e Score 250EC sobre a sobrevivência dos ovos do peixe <i>Danio rerio</i> . As linhas côncavas nas menores concentrações representam um efeito antagônico e as linhas convexas acima da CE ₅₀ representam efeito sinérgico .	57
Figura 2. 9 - Gráfico da distância total percorrida pelas larvas de <i>Danio rerio</i> expostas à diferentes concentrações subletais do Kraft 36EC® e do Score 250EC®. Em ambos, variou-se as condições de claro (minuto 1 ao minuto 5 e minuto 11 ao 15) e de escuro (de 6 a 10 e 16 a 20 minutos).....	58

Capítulo 3

Figura 3. 1 – Ilustração sobre a atuação das enzimas de defesa antioxidantes convertendo os radicais reativos em moléculas não reativas	67
Figura 3. 2 – Ilustração das diferentes fases do metabolismo de biotransformação de compostos tóxicos e as enzimas e parâmetros que podem ser quantificados em cada processo. Adaptado de https://smart.servier.com	68
Figura 3. 3 – Fotos dos experimentos de laboratório para análise de biomarcadores em brânquias de <i>Danio rerio</i> expostos aos diferentes tratamentos	71
Figura 3. 4 - Cromatograma mostrando os picos da curva de concentrações conhecidas de TBA-MDA previamente injetadas em HPLC/UV/VIS e que foram utilizadas para a quantificação dos níveis de MDA nas brânquias de <i>Danio rerio</i>	74
Figura 3. 5 – Gráficos das atividades das enzimas de biotransformação etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glucuronil-transferase (UDPGT) e glutathione – S – transferase (GST); das enzimas de defesa antioxidante catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR); e peroxidação lipídica pela medida dos níveis malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (HL) analisados em brânquias de <i>Danio rerio</i> expostos por 48h às CENO de cada composto	77
Figura 3. 6 – Gráfico das diferenças significativas do IBR v2 calculados em relação ao controle.....	79
Figura 3. 7 – <i>Starplots</i> construídas a partir da análise do IBR mostrando a influência em relação ao controle das respostas de cada biomarcador nas diferentes exposições	80

Capítulo 4

Figura 4. 1 – Imagens dos tanques de mesocosmos sendo montados	92
Figura 4. 2 – Fotos com os detalhes da montagem e estabilização dos mesocosmos. A: Foto dos 26 mesocosmos montados em caixas d'água de 500L. B: Foto da coleta de diferentes comunidades realizada em uma das represas. C: Foto do momento em que as comunidades coletadas foram adicionadas aos tanques. D: Foto das macrófitas coletadas inseridas no sistema. E: Foto da medida de parâmetros físico-químicos realizados com o multisonda Horiba. F: Foto mostrando as bombas submersas e as mangueiras que interligam um tanque ao outro. G e H: Foto das gaiolas em que os peixes foram inseridos nos tanques. Fotos por: Evaldo Luiz G. Espíndola	93
Figura 4. 3 – Fotos com os detalhes da simulação do <i>runoff</i> e contaminação dos mesocosmos por <i>spray drift</i> . A: Foto das parcelas de terra preparadas para receber a aplicação dos agrotóxicos. Detalhe para	

os recipientes instalados abaixo das parcelas para captação da água de <i>runoff</i> . B: Foto da aplicação das caldas dos agrotóxicos nas concentrações recomendadas pelos fabricantes para a cultura de morando (Kraft 36EC® = 30 mL/100 L de água, o que corresponde a 0,1 L/m ² de calda; Score 250EC® = 0,40 mL/100 L o que corresponde a 0,020 L/m ² do produto. C: Foto dos chuveiros instalados acima das parcelas de solo para a simulação da chuva torrencial. D: Foto do momento da simulação da chuva nas três parcelas simultaneamente. E: Foto do momento em que a água de <i>runoff</i> coletada da simulação foi adicionada aos mesocosmos. F: Foto do momento em que o tratamento de <i>spray drift</i> foi aplicado no mesocosmos. Fotos por: Evaldo Luiz G. Espíndola.....	94
Figura 4. 4 – Gráficos das atividades das enzimas de biotransformação etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glucuronil-transferase (UDPGT) e glutathione – S – transferase (GST); das enzimas de defesa antioxidante catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR); e peroxidação lipídica pela medida dos níveis malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (HL) analisados em brânquias de <i>Danio rerio</i> expostos por 96h em mesocosmos ao <i>runoff</i> e <i>spray drift</i> dos agrotóxicos Kraft 36EC® + Score 250EC®. * Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.....	100
Figura 4. 5 – Gráfico das diferenças significativas do IBR v2 calculados em relação ao controle.....	101
Figura 4. 6 – <i>Starplots</i> construídas a partir da análise do IBRv2 mostrando a influência em relação ao controle das respostas de cada biomarcador nas diferentes exposições. Se a linha vermelha dos tratamentos estiver fora da azul, o parâmetro analisado foi aumentado, e se a linha vermelha estiver dentro do azul, o parâmetro foi diminuído, comparado ao grupo controle	102
Figura 4. 7. Análise multivariada explicando 35% da variância dos biomarcadores causada pela influência das variáveis ambientais.....	105

APÊNICE C

Figura C. 1 – Fotos dos adultos de <i>Danio rerio</i> cultivados e obtidos em piscicultura sendo aclimatados no laboratório em aquários	154
Figura C. 2 - Curva de sensibilidade dos lotes de peixes <i>Danio rerio</i> utilizados em todos os experimentos	155

APÊNDICE D

Figura D. 1 – Equipamento HPLC/MS/MS Agilent® 6490 series utilizado nas quantificações da abamectina e difenoconazol nas amostras de água e sedimento	163
Figura D. 2 - Picos analíticos dos íons quantificadores e qualificadores, respectivamente, dos compostos abamectina (A) e difenoconazol (B)	164
Figura D. 3 - Curvas de calibração dos métodos de determinação dos compostos abamectina (esquerda) e difenoconazol (direita). Com 99,9% de confiança o método foi considerado linear para ambos os métodos	164

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. 1 - Combinações das concentrações utilizadas e volumes em µL da solução estoque adicionados de cada composto aos recipientes de 1L no teste de toxicidade da mistura abamectina + difenoconazol	32
Tabela 1. 2 - Combinações das concentrações e volumes de calda em µL de cada composto adicionados aos recipientes de 1L no teste de toxicidade com misturas de Kraft 36EC® + Score 250EC®.....	33
Tabela 1. 3 - Interpretação dos parâmetros “a” e “b” que definem os padrões de desvios dos modelos teóricos de ação independente (IA). Adaptado de Jonker et al. (2005).....	35
Tabela 1. 4 - Sumário das análises dos testes de toxicidade aguda utilizando como organismo teste adultos de <i>Danio rerio</i> expostos às misturas de abamectina + difenoconazol e Kraft 36EC® + Score250EC®.....	38

Capítulo 2

Tabela 2. 1 - Sumário da análise do teste de toxicidade realizado com o peixe <i>Danio rerio</i> , quando a sobrevivência dos ovos foi observada nas exposições das misturas de Kraft 36EC® e Score 250EC®	56
Tabela 2. 2 - Valores selecionados de toxicidade em curto prazo de abamectina e ivermectina para adultos de zebrafish, juvenis e embriões	59
Tabela 2. 3 - Valores selecionados de toxicidade a curto prazo do difenoconazol para adultos de zebrafish, juvenis e embriões	61

Capítulo 3

Tabela 3. 1 - Concentrações subletais (CENO, 48h) utilizadas nos experimentos de exposição para análise de biomarcadores nas brânquias de peixes <i>Danio rerio</i> . Os valores foram calculados a partir de resultados de testes de toxicidade descritos no Capítulo 1	71
Tabela 3. 2 - Dados das atividades das enzimas de biotransformação etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glucuronil-transferase (UDPGT) e glutathione – S – transferase (GST); das enzimas de defesa antioxidante catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR); e peroxidação lipídica pela medida dos níveis malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (HL) analisados em brânquias de <i>Danio rerio</i> expostos por 48h às CENO de cada composto. As médias e desvios estão expressos em nmol/min/mg de proteína (EROD, UDPGT, HL e MDA) e U/mg de proteína (GST, CAT, GPx e GR). * Diferenças estatisticamente significativas	76

Capítulo 4

Tabela 4. 1 - Parâmetros, variáveis e seus respectivos métodos utilizados nas análises da água dos mesocosmos coletada ao longo da contaminação	95
Tabela 4. 2 - Tabela com valores de CL ₅₀ e CENO de cada composto obtidos nos testes de toxicidade preliminares, além dos valores teóricos calculados das concentrações de abamectina e difenoconazol presentes nos produtos comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC®, respectivamente, utilizados nos mesocosmos nas exposições com o <i>runoff</i> e <i>spray drift</i>	97
Tabela 4. 3 - Dados das atividades das enzimas de biotransformação etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glucuronil-transferase (UDPGT) e glutathione - S - transferase (GST); das enzimas de defesa antioxidante catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR); e peroxidação lipídica pela medida dos níveis malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (HL) analisados em brânquias de <i>Danio rerio</i> expostos por 96h em mesocosmos ao <i>runoff</i> e <i>spray drift</i> dos agrotóxicos Kraft 36EC® + Score 250EC®. As médias e desvios estão expressos em nmol/min/mg de proteína (EROD, UDPGT, HL e MDA) e U/mg de proteína (GST, CAT, GPx e GR). * Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.....	99
Tabela 4. 4 – Tabela comparativa dos resultados dos biomarcadores analisados em brânquias de adultos de <i>Danio rerio</i> nos experimentos realizados em laboratório, após 48h de exposição aos tratamentos; e em mesocosmos, após 96h de exposição. Um aumento da atividade enzimática ou nos níveis dos parâmetros está indicado por “↑”, a diminuição está indicada por “↓” e a ausência de efeito significativo por “-”. As informações contidas na tabela correspondem às respostas dos biomarcadores analisados individualmente.	104

APÊNCIDE C

Tabela C. 1 - Biometria dos lotes de peixes <i>Danio rerio</i> utilizados em todos os experimentos	155
Tabela C. 2 - Média ± desvio padrão das variáveis físico-químicas medidas no início e ao final dos experimentos realizados em laboratório.....	156
Tabela C. 3 - Médias e desvios da concentração de amônia (µg L ⁻¹), pH e oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹) medidos nos experimentos de exposição em laboratório para a determinação de biomarcadores	157
Tabela C. 4 - Médias ± desvio padrão de pH medidos no período da manhã	157
Tabela C. 5 - Médias ± desvio padrão de pH medidos no período da tarde.....	157
Tabela C. 6 - Médias ± desvio padrão de condutividade medida no período da manhã	158
Tabela C. 7 - Médias ± desvio padrão de condutividade medida no período da tarde.....	158
Tabela C. 8 - Médias ± desvio padrão de oxigênio dissolvido medido no período da manhã	158
Tabela C. 9 - Médias ± desvio padrão de oxigênio dissolvido medido no período da tarde.....	158
Tabela C. 10 - Médias ± desvio padrão das medidas de temperatura medida no período da manhã..	158
Tabela C. 11 - Médias ± desvio padrão das medidas de temperatura medida no período da tarde.....	159

Tabela C. 12 - Médias $\pm$ desvio padrão das medidas de amônia durante a contaminação dos mesocosmos	159
Tabela C. 13 - Médias $\pm$ desvio padrão das medidas de material em suspensão, alcalinidade, turbidez e clorofila α , no dia da contaminação dos mesocosmos	159
Tabela C. 14 - Médias $\pm$ desvio padrão das medidas de nitrito (NO_2 em $\mu\text{g L}^{-1}$), nitrato (NO_3 em $\mu\text{g L}^{-1}$), nitrogênio orgânico total (NT em mg L^{-1}), fosfato inorgânico (POI em $\mu\text{g L}^{-1}$), fósforo total (PT em $\mu\text{g L}^{-1}$) e silicato (SiO_2 em mg L^{-1}), no dia da contaminação dos mesocosmos.....	159

APÊNDICE D

Tabela D. 1 - Descrição dos métodos de determinação da abamectina e do difenoconazol otimizados para o equipamento HPLC/MS/MS Tecnologia Agilent	163
Tabela D. 2 – Dados de repetibilidade para calcular a precisão dos métodos de determinação da abamectina, a partir dos valores de DPR, e avaliação da exatidão. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$	165
Tabela D. 3 – Dados de repetibilidade para calcular a precisão dos métodos de determinação do difenoconazol, a partir dos valores de DPR, e avaliação da exatidão. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$	166
Tabela D. 4 – Dados para a análise da robustez dos métodos de determinação da abamectina a partir dos valores de DPR variando-se as matrizes água e sedimento. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$..	168
Tabela D. 5 – Dados para a análise da robustez dos métodos de determinação do difenoconazol a partir dos valores de DPR variando-se as matrizes água e sedimento. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$..	168
Tabela D. 6 – Concentrações quantificadas de abamectina na calda de Kraft 36 EC® e no sedimento. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$	169
Tabela D. 7 – Concentrações quantificadas de difenoconazol na calda de Score 250 EC® e no sedimento. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$	169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CE ₅₀	Concentração de um composto de efeito a 50% da população
citP450	Citocromo P450
CL ₅₀	Concentração de um composto letal a 50% da população
CL ₁₀	Concentração de um composto letal a 10% da população
CV	Coeficiente de variação
CYP1A	Isoforma 1A do citocromo P450
DPR	Desvio padrão relativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EROD	7-etóxi-resorufina-O-deetilase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSSG	Glutathione disulfide oxidized
GSH	Glutathione
GST	Glutathione-S-Transferase
HP	Hidroperóxidos lipídicos
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IA	Modelo de ação independente
i.a.	Ingrediente ativo
MDA	Malondialdehyde
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PC	Proteínas Carboniladas
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UDPGT	Glucuronosyltransferase

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
APRESENTAÇÃO DA TESE	18
1. Introdução geral.....	19
1.1 O uso de praguicidas em ecossistemas de clima tropical	19
1.2 Ecotoxicologia e os biomarcadores de efeito.....	20
2. Justificativa.....	21
3. Hipóteses	23
4. Objetivos gerais.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
Capítulo 1	27
1. Introdução.....	28
2. Objetivo.....	29
3. Material e métodos	30
3.1 Organismos teste e aclimação	30
3.2 Testes de toxicidade.....	30
3.3 Análises químicas de abamectina, difenoconazol e variáveis físico-químicas.....	34
3.4 Análise dos dados	34
4. Resultados e discussão	35
4.1 Análises químicas de abamectina e difenoconazol e variáveis físico-químicas	35
4.2 Testes de toxicidade isolados: ingredientes ativos x formulações comerciais	35
4.3 Toxicidade de misturas	37
5. Conclusão	41
REFERÊNCIAS.....	41
Capítulo 2	45
1. Introdução.....	46
2. Objetivos	48
3. Material e métodos	49
3.1 Praguicidas.....	49
3.2 Organismos teste.....	49
3.3 Exposições isoladas ao Kraft 36EC® e ao Score 250EC® - FET.....	50
3.4 Exposições às misturas de Kraft 36EC® e Score 250EC®	51
3.5 Análise de comportamento	52
3.6 Análises químicas dos compostos.....	53

3.7	Análise estatística dos dados.....	53
4.	Resultados	54
4.1	Testes FET – compostos isolados	54
4.2	Testes misturas.....	55
4.3	Testes comportamento	57
5.	Discussão.....	58
6.	Conclusão	62
	REFERÊNCIAS.....	62
	Capítulo 3	65
1.	Introdução.....	66
2.	Objetivos	69
3.	Material e métodos	70
3.1	Organismos teste e aclimação	70
3.2	Exposições em laboratório para análise de biomarcadores.....	70
3.3	Biomarcadores	72
3.3.1	Análise das enzimas de biotransformação	72
3.3.2	Análise das enzimas de defesa antioxidante.....	73
3.3.3	Análise da peroxidação lipídica.....	73
3.3.4	Quantificação de proteínas totais.....	74
3.4	Análises químicas e variáveis físico-químicas	74
3.5	Análise estatística dos dados.....	75
4.	Resultados e discussão	75
4.1	Biomarcadores	75
5.	Conclusão	82
	REFERÊNCIAS.....	82
	Capítulo 4	87
1.	Introdução.....	88
2.	Objetivo.....	91
3.	Material e métodos	91
3.1	Montagem e estabilização dos mesocosmos.....	92
3.2	Simulador de <i>runoff</i> e <i>spray drift</i>	93
3.3	Organismo teste e aclimação	95
3.4	Análises físico-químicas e limnológicas da água dos mesocosmos	95
3.5	Quantificações e concentrações dos agrotóxicos.....	96

3.6	Biomarcadores bioquímicos	97
3.7	Análise estatística dos dados.....	98
4.	Resultados e discussão	98
4.1	Biomarcadores bioquímicos	98
5.	Conclusão	106
	REFERÊNCIAS.....	106
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
	REFERÊNCIAS.....	114
	APÊNDICE A – Artigo publicado referente ao Capítulo 1	115
1.	Introduction.....	116
2.	Materials and methods	118
2.1.	<i>Test organisms and acclimatization</i>	118
2.2.	<i>Toxicity tests</i>	118
2.3.	<i>Chemical analysis of the test substances</i>	119
2.4.	<i>Data analysis</i>	120
3.	Results and discussion	121
3.1.	<i>Test performance</i>	121
3.2.	<i>Single compound toxicity</i>	121
3.3.	<i>Mixture toxicity</i>	121
3.4.	<i>Implications for risk assessment and concluding remarks</i>	124
	Acknowledgments	126
	References.....	127
	APÊNDICE B – Artigo publicado referente ao Capítulo 2	131
1.	Introduction.....	132
2.	Materials and methods	134
3.	Results and discussion	136
	Acknowledgments	145
	References.....	146
	APÊNDICE C – Aclimação, biometria, testes de sensibilidade e variáveis físico-químicas com adultos de <i>Danio rerio</i>	153
	APÊNDICE D – Análises químicas da abamectina e do difenoconazol nas matrizes de água e sedimento.....	161
	ANEXO – Aprovação da comissão de ética.....	171

APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese de doutorado é apresentada em quatro capítulos estruturados em Resumo, Introdução, Objetivos, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Além dos capítulos, a tese contém os seguintes itens: Introdução Geral, Justificativa, Hipóteses, Objetivos Gerais, Considerações Finais (na qual se faz uma análise conjunta de todos os resultados), Apêndices e Anexo.

No **Capítulo 1 - Toxicidade da abamectina, do difenoconazol e de suas formulações comerciais a adultos de *Danio rerio* em exposições isoladas e misturas** - estão descritos os resultados obtidos nos primeiros testes de toxicidade realizados em laboratório com adultos de *Danio rerio*. Este capítulo foi publicado em inglês em forma de artigo na revista internacional Chemosphere (Fator de Impacto 4,208), no ano de 2017, e uma cópia do exemplar encontra-se no APÊNDICE A.

O **Capítulo 2 - Estudo comparativo dos efeitos tóxicos gerados em embriões e adultos de peixes *Danio rerio* expostos ao inseticida Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e ao fungicida Score 250EC® (i.a. difenoconazol)** - traz os resultados obtidos nos testes de toxicidade e comportamento com embriões de *Danio rerio*, realizados no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro – Portugal, a partir do financiamento da FAPESP (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior - BEPE). Este capítulo foi publicado em inglês na forma de artigo na revista internacional Chemosphere (Fator de Impacto 4,208), no ano de 2018 e uma cópia do exemplar encontra-se no APÊNDICE B.

O **Capítulo 3 - Análise de biomarcadores em brânquias de *Danio rerio* expostos a abamectina, ao difenoconazol e suas formulações comerciais (Kraft 36EC® e Score 250EC®), em exposições isoladas e misturas** - aborda os resultados da avaliação dos biomarcadores bioquímicos em brânquias de adultos de *Danio rerio* realizados em laboratório e discute sobre o metabolismo de detoxificação e a toxicocinética dos compostos estudados em peixes.

O **Capítulo 4 - Análise de biomarcadores em brânquias de *Danio rerio* expostos em mesocosmos ao runoff e spray drift dos pesticidas Kraft 36EC® e Score 250EC®** - traz os resultados dos experimentos de mesocosmos realizados com adulto de *Danio rerio* e discute sobre a relevância ecológica dos experimentos de campo, bem como a influência das variáveis ambientais nos resultados.

1. Introdução geral

1.1 O uso de praguicidas em ecossistemas de clima tropical

Muitos dos países em desenvolvimento, localizados em regiões tropicais, são economicamente dependentes da agricultura, e para obter altos índices de rendimento na produção o uso de praguicidas nas culturas é cada vez mais intensificado. Como consequência do uso indiscriminado desses compostos, o risco de danos ambientais nesses países é alarmante devido à carência de medidas de segurança mais efetivas a fim de minimizar os impactos ambientais negativos (DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; EMBRAPA, 2006).

A expansão da agricultura é uma das principais ameaças para a conservação da biodiversidade de comunidades aquáticas. Nos ecossistemas tropicais as características geoclimáticas típicas destes locais podem intensificar a taxa de contaminação das águas superficiais por agrotóxicos (CARRIQUIRIBORDE et al., 2014; LEWIS et al., 2016). São muitas as causas que levam agrotóxicos a serem encontrados nas águas superficiais, como o escoamento superficial causado pelos elevados índices pluviométricos (*runoff*); as más práticas agrícolas e lavagem de embalagens em poças, rios, lagos e lagoas; irrigação intensiva; pulverização próximo aos corpos hídricos (*spray drift*), condições precárias de transporte e armazenamento; excesso de aplicações; uso de formulações mais concentradas para melhor eficiência; entre outras (DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; LEWIS et al., 2016).

Além dos problemas de saúde pública, em que comunidades são diariamente expostas a agrotóxicos direta ou indiretamente, na lavoura ou pela água contaminada, problemas de ordem ecológica são frequentes devido à contaminação de corpos aquáticos próximos aos campos agrícolas, pois a ocorrência de chuvas acaba resultando em um maior transporte de partículas e agrotóxicos aos ecossistemas aquáticos pelo escoamento de água superficial (*runoff*) (ESPÍNDOLA, 2011; PATERNIANI, 2001).

Alguns autores afirmam que os riscos gerados por praguicidas aplicados em regiões de clima tropical não diferem significativamente em relação a regiões temperadas (DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; LAABS et al., 2007). Porém, estudos mostram que as precipitações que ocorrem nos trópicos aumentam os riscos ambientais devido ao maior transporte de compostos por *runoff* a compartimentos aquáticos. Além disso, fatores como a qualidade do solo, que interfere na mobilidade dos compostos, e temperaturas mais elevadas, que aumentam a solubilidade dos compostos em água e a absorção por organismos não alvos, intensificam os riscos ambientais (SANCHEZ-BAYO; HYNE, 2011).

Estudos ecotoxicológicos sobre o efeito de agrotóxicos no ambiente têm sido realizados considerando dados obtidos de estudos em regiões de clima temperado. Porém, as condições geoclimáticas características de cada ecossistema afetam diretamente no efeito tóxico dessas substâncias a organismos não alvos. Dessa forma, a avaliação dos riscos ambientais gerados por praguicidas em condições tropicais é essencialmente recomendada (DAAM; VAN DEN BRINK, 2010).

1.2 Ecotoxicologia e os biomarcadores de efeito

Na avaliação da qualidade da água, os parâmetros físicos e químicos são muito utilizados para determinar a origem e concentrações de contaminantes. Porém, esses métodos sozinhos possuem a desvantagem de não detectarem alterações nos organismos que vivem nesse sistema, gerando uma informação parcial sobre a qualidade da água, o que pode ser mais bem avaliado pelos estudos ecotoxicológicos (ALMEIDA; RIBEIRO, 2014).

De acordo com Zagato e Bertolotti (2006), a ecotoxicologia estuda o impacto causado por contaminantes em ecossistemas naturais por meio da avaliação dos efeitos de poluentes sobre os organismos e a interação destes com seus habitats. Por meio de ensaios ecotoxicológicos é possível prever quanto e como a presença de compostos químicos afetam a vida de espécies, suas interações, comunidades e até mesmo ecossistemas (RELYEA, 2009). Existem diferentes tipos de ensaios ecotoxicológicos, sendo os mais utilizados os testes de toxicidade que podem ser agudos ou crônicos, em que a letalidade ou qualquer manifestação antecedente a ela são os efeitos avaliados nos organismos teste (COSTA et al., 2008).

Muitos são os organismos usados em estudos ecotoxicológicos e considerados bons indicadores, como, por exemplo, os oligoquetas, dípteros e principalmente organismos aquáticos como algas, cladóceros e peixes (ALMEIDA; RIBEIRO, 2014; COSTANTINI, 2010; NUNES; ESPÍNDOLA, 2012). O uso de peixes em ensaios ecotoxicológicos é prática comum, pois são bons representantes do compartimento aquático e ocupam uma importante função na cadeia trófica (ALMEIDA; RIBEIRO, 2014; COSTANTINI, 2010).

A espécie de peixe *Danio rerio* é internacionalmente recomendada e muito utilizada em ensaios ecotoxicológicos com diferentes tipos de contaminantes devido ao fato de ser uma espécie sensível, de pequeno tamanho, de fácil cultivo e manutenção no laboratório, e por ter reprodução contínua ao longo do ano (ABNT, 2016). Estudos anteriores utilizando *Danio rerio* expostos a diferentes compostos já foram realizados em diferentes abordagens. Muitos deles foram realizados em laboratório, os quais proporcionam resultados confiáveis e de alta

reprodutibilidade, porém, paralelamente a eles, testes *in situ* são recomendados, pois oferecem resultados ecologicamente mais relevantes (NOVELLI et al., 2012a).

Ensaio ecotoxicológicos realizados *in situ*, ou em condições seminaturais (mesocosmos), representam uma situação de exposição sob condições mais realistas, em que variáveis ambientais não são controladas (LAABS et al., 2007). Mesocosmos são, portanto, ecossistemas artificiais em menor escala mantidos sob condições naturais, e que são facilmente amostrados para a avaliação de efeitos ambientais. Muitos são os estudos realizados com mesocosmos, e estes são considerados uma ferramenta útil em pesquisas ecotoxicológicas (CAQUET et al., 1996; DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; LAABS et al., 2007; MOREIRA et al., 2017; NOVELLI et al., 2012a).

Outra ferramenta importante em ensaios ecotoxicológicos são os biomarcadores bioquímicos, que são usados para avaliar o efeito tóxico de substâncias poluentes em corpos aquáticos e a relação dose-efeito nos organismos, a partir das respostas biológicas medidas em fluidos e tecidos de organismos não alvos. Os biomarcadores atuam como sistemas de aviso precoce, evitando assim que danos irreversíveis ocorram, como mutações genéticas e até a morte celular (ALMEIDA; RIBEIRO, 2014; NOGUEIRA et al., 2011).

Em uma situação de contaminação, organismos aquáticos podem absorver e acumular compostos químicos em seus tecidos e órgãos. O metabolismo de detoxificação desses organismos age de forma a eliminar esses compostos, excretando-os. Para isso, ocorrem diversas reações catalisadas por enzimas que transformam esses contaminantes em compostos solúveis para serem mais facilmente excretados. A atividade de enzimas de biotransformação, de defesa antioxidante e parâmetros de estresse oxidativo são exemplos de biomarcadores utilizados em análises ecotoxicológicas (ALMEIDA; RIBEIRO, 2014).

2. Justificativa

O Brasil é considerado o principal consumidor de agrotóxicos do mundo desde 2008, dominando cerca de 20% do consumo mundial. No total, são aprovados 381 ingredientes ativos para utilização principalmente como herbicida, fungicida e inseticida, porém são mais de 2400 formulações comerciais produzidas no país, por 130 fabricantes diferentes. Em 2012 mais de 800 mil toneladas entre herbicidas, fungicidas e inseticidas foram comercializados no país (ALBUQUERQUE et al., 2016; BARBOSA; SOLANO; UMBUZEIRO, 2015; CARNEIRO et al., 2015).

Além do uso excessivo de agrotóxicos e da elevada toxicidade dos mesmos, as características geográficas da região intensificam os riscos ambientais. Países tropicais, como o Brasil, possuem um regime pluviométrico intenso influenciando de forma significativa no destino desses compostos. Em regiões de declives acentuados ocorre um aumento no escoamento superficial da água favorecendo o transporte de agrotóxicos aos mananciais locais via *runoff* (DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; MOREIRA et al., 2017; SANCHEZ-BAYO; HYNE, 2011).

O local de referência escolhido para o desenvolvimento desta pesquisa é a região de Bom Repouso, MG, pois é uma região representativa de regiões de climas tropicais, com prática agrícola expressiva. Estudos anteriores do grupo mostram o impacto ambiental negativo gerado na região como consequência da utilização constante de agrotóxicos nas culturas, demonstrando práticas agrícolas inadequadas, mesmo reconhecendo os fatores de risco (ESPÍNDOLA, 2011; NOVELLI et al., 2012b, 2012a; NUNES; ESPÍNDOLA, 2012; SILVA, 2016).

No estudo realizado por Silva (2016), verificou-se que os principais agrotóxicos utilizados nas culturas de morango nas áreas agrícolas de Bom Repouso são o inseticida Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e o fungicida Score 250EC® (i.a. difenoconazol), sendo que o produto comercial Kraft 36EC® substituiu o uso do Vertimec 18EC®, de mesmo ingrediente ativo.

A abamectina é um composto pertencente ao grupo das ivermectinas e é muito utilizada como antiparasitária na medicina veterinária e também na agricultura como inseticida (DIONISIO; RATH, 2016). O difenoconazol é um composto do grupo dos triazóis e atua como fungicida (MU et al., 2013). O inseticida Kraft 36EC® (i. a. abamectina) e o fungicida Score 250EC® (i.a. difenoconazol) são compostos considerados extremamente tóxicos e muito perigosos ao meio ambiente (CHEMINOVA, 2014; SYNGENTA, 2017).

Inseticidas e fungicidas são a segunda e terceira classes de agrotóxicos mais utilizados no Brasil, e despertam preocupação de pesquisadores devido ao elevado potencial de risco à vida aquática. Em um estudo recente realizado com apenas 11% do total de ingredientes ativos aprovados no Brasil, foi observado efeito tóxico a organismos aquáticos em pelo menos 59% das amostras de água coletadas em cinco estados brasileiros diferentes (ALBUQUERQUE et al., 2016).

A exposição de comunidades aquáticas às misturas de inúmeros compostos que são lançados no ambiente e que acabam atingindo os corpos hídricos é uma triste realidade, e dados sobre o risco ambiental de misturas de pesticidas em águas superficiais no Brasil muitas

vezes são limitados e escassos. Além disso, a avaliação de risco de pesticidas é normalmente feita a partir da toxicidade dos princípios ativos dos praguicidas a organismos não alvos, não considerando os potenciais efeitos nocivos das formulações comerciais. Estudos realizados anteriormente com diferentes compostos mostram que alguns produtos comerciais apresentam maior toxicidade a organismos não alvos quando comparado aos seus princípios ativos (COX; SURGAN, 2006).

Dessa forma, consideramos relevante o estudo do efeito ambiental dos produtos comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC®, de seus ingredientes ativos e de suas misturas a organismos não alvos, como os peixes.

3. Hipóteses

Diante do exposto, o presente estudo foi desenvolvido com o intuito de testar algumas hipóteses:

- Os produtos comerciais dos praguicidas Kraft 36EC® e Score 250EC® produzem mais efeitos deletérios a organismos aquáticos e, portanto, são mais perigosos ao meio ambiente quando comparado com os respectivos princípios ativos abamectina e difenoconazol;
- Os efeitos ambientais gerados pelos praguicidas Kraft 36EC® e Score 250EC® e seus princípios ativos, quando expostos em misturas a organismos aquáticos, tem sua toxicidade e seus efeitos deletérios potencializados, caracterizando uma interação sinérgica;
- Biomarcadores são ferramentas indicadas para avaliar os efeitos ambientais dos praguicidas Kraft 36EC® e Score 250EC® e de seus princípios ativos, uma vez que a exposição de peixes *Danio rerio* a esses compostos é capaz de alterar significativamente as atividades de enzimas de biotransformação, de defesa antioxidante e de parâmetros de estresse oxidativo;
- Apesar da capacidade de retenção dos praguicidas Kraft 36EC® e Score 250EC® no solo, o que minimizaria a toxicidade dos compostos a organismos aquáticos, o efeito provocado pelas cargas de *runoff* contaminada com esses compostos e que chegam a ecossistemas aquáticos, bem como a ocorrência de *spray drift*, geram impactos negativos a organismos não alvos.

4. Objetivos gerais

Este estudo teve como principal objetivo avaliar os efeitos tóxicos dos praguicidas Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e Score 250EC® (i.a. difenoconazol), e de seus ingredientes ativos, em diferentes estágios de vida do peixe *Danio rerio*, a fim de avaliar em que condições a exposição a esses compostos é capaz de potencializar os efeitos deletérios a estes organismos aquáticos.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar e comparar a toxicidade dos princípios ativos abamectina e difenoconazol e dos produtos comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC®, isolados e em misturas, por meio de testes de toxicidade aguda (CL₅₀) com adultos de *Danio rerio*, a fim de investigar se os produtos comerciais possuem maior toxicidade que os princípios ativos e se a exposição às misturas desses compostos potencializa a toxicidade a peixes;
- Avaliar a toxicidade dos produtos comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC®, isolados e em misturas, em embriões de *Danio rerio* por meio de testes FET (*Fish Embryo Toxicity Test*) e testes de comportamento a fim de investigar qual estágio de vida mais sensível do peixe;
- Avaliar os efeitos ambientais gerados pelos princípios ativos abamectina e difenoconazol e pelos produtos comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC®, isolados e em misturas, a partir da análise de biomarcadores bioquímicos (enzimas de biotransformação, enzimas de defesa antioxidante e parâmetros indicativos de estresse oxidativo), em adultos de *Danio rerio*, a fim de investigar se os produtos comerciais geram mais efeitos deletérios no metabolismo dos organismos que os princípios ativos, e se às misturas desses compostos potencializam esses efeitos em peixes;
- Simular e avaliar os efeitos ambientais gerados em ecossistemas aquáticos tropicais pelo escoamento de água superficial (*runoff*) ocorrência do *spray drift* contaminados com resíduos dos praguicidas Kraft 36EC® (abamectina) e Score 250EC® (difenoconazol), isolados e em misturas, por meio da análise de biomarcadores indicativos de estresse oxidativo em adultos de *Danio rerio*, em exposições *in situ* (mesocosmos), a fim de investigar se em condições mais realistas o efeito é minimizado;

REFERÊNCIAS

- ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes**, 2016.
- ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.
- ALMEIDA, E. A. DE; RIBEIRO, C. A. DE O. **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems**. Group, Taylor & Francis, 2014. 402p.
- BARBOSA, A. M. C.; SOLANO, M. DE L. M.; UMBUZEIRO, G. DE A. Pesticides in Drinking Water – The Brazilian Monitoring Program. **Frontiers in Public Health**, v. 3, n. November, p. 1–10, 2015.
- CAQUET, T. et al. Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 34, n. 2, p. 125–133, 1996.
- CARNEIRO, F. F. (ORG. . et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Editora Expressão Popular, 2015.
- CARRIQUIRIBORDE, P. et al. Aquatic risk assessment of pesticides in Latin America. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 10, n. 4, p. 539–542, 2014.
- CHEMINOVA. **KRAFT 36EC®**. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/kraft.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2018.
- COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.
- COSTANTINI, D. Redox physiology in animal function: The struggle of living in an oxidant environment. **Current Zoology**, v. 56, n. 6, p. 687–702, 2010.
- COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803–1806, 2006.
- DAAM, M. A.; VAN DEN BRINK, P. J. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 24–37, 2010.
- DIONISIO, A. C.; RATH, S. Abamectin in soils: Analytical methods, kinetics, sorption and dissipation. **Chemosphere**, v. 151, p. 17–29, 2016.
- EMBRAPA. Agricultura tropical: o Brasil construindo o futuro. **Caderno especial**, v. 1, p. 18, 2006.
- ESPÍNDOLA, E. A. **Análise da percepção de risco do uso de agrotóxicos em áreas rurais: um estudo junto aos agricultores no município de Bom Repouso (MG)**. (Tese de doutorado) - Escola de Engenharia de São carlos, Universidade de São Paulo, 2011.
- LAABS, V. et al. Pesticide fate in tropical wetlands of Brazil: An aquatic microcosm study

under semi-field conditions. **Chemosphere**, v. 67, n. 5, p. 975–989, 2007.

LEWIS, S. E. et al. Pesticide Behavior, Fate, and Effects in the Tropics: An Overview of the Current State of Knowledge. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 20, p. 3917–3924, 2016.

MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58–66, 2017.

MU, X. et al. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 147–157, 2013.

NOGUEIRA, L. et al. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 97–105, 2011.

NOVELLI, A. et al. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec®18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, n. 1, p. 87–93, 2012a.

NOVELLI, A. et al. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 36–40, 2012b.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 1063–1071, 2012.

PATERNIANI, E. **Agricultura sustentável nos trópicos**. Estudos Avançados. **Anais...**2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ea/v15n43/v15n43a23.pdf>>

RELYEA, R. A. A cocktail of contaminants: How mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. **Oecologia**, v. 159, n. 2, p. 363–376, 2009.

SANCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R. V. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 577–586, 2011.

SILVA, M. R. **Gestão de embalagens de agrotóxicos - logística reversa em pequenos municípios brasileiros: o caso do município de Bom Repouso, MG**. (Dissertação de mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

SYNGENTA. **SCORE** ®. Disponível em: <https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/score_1.pdf?token=1511171921>. Acesso em: 19 fev. 2018.

ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.472p.

Capítulo 1

Toxicidade da abamectina, do difenoconazol e de suas formulações comerciais a adultos de *Danio rerio* em exposições isoladas e misturas

Ana Letícia Madeira Sanches ^a, Bruna Horvath Vieira ^a, Marina Vanderlei Reghini ^a, Raquel Aparecida Moreira ^b, Emanuela Cristina Freitas ^a, Evaldo L.G. Espíndola ^a, Michiel A. Daam^{a, c}

^a NEEA/CRHEA/SHS, Escola de Engenharia de São Carlos, Av. Trabalhador São Carlense, 400, 13.560-970 São Carlos, Brasil

^b Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luis, Km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brasil

^c CENSE, Departamento de Engenharia e Ciências Ambientais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal

RESUMO

Apesar do intenso uso de agrotóxicos em países tropicais como o Brasil, estudos de avaliação de risco de misturas sobre estes compostos ainda são escassos. Misturas de agrotóxicos são aplicadas nas culturas agrícolas a fim de aumentar a eficiência dos produtos e garantir uma boa produção, porém a presença de misturas destes compostos na água pode potencializar os efeitos tóxicos a organismos aquáticos não alvos. Além disso, compostos aditivos “inertes” como, por exemplo, surfactantes e emulsificantes presentes nas formulações comerciais de agrotóxicos podem influenciar na toxicidade dos ingredientes ativos a organismos aquáticos. O inseticida Kraft 36EC® (i. a. abamectina) e o fungicida Score 250EC® (i.a. difenoconazol) são compostos considerados extremamente tóxicos e muito perigosos ao meio ambiente e, apesar disso, são os agrotóxicos mais utilizados nas culturas de morango do Brasil. O objetivo deste estudo é avaliar a toxicidade aguda dos agrotóxicos Kraft 36EC® e Score 250EC® e de seus princípios ativos abamectina e difenoconazol, respectivamente, a adultos de *Danio rerio* a partir de testes em laboratórios em exposições isoladas e em misturas. Nos testes de toxicidade dos compostos isolados os valores de CL₅₀, 48h obtidos para a abamectina e o Kraft 36EC® foram de 58,6 µg L⁻¹ (53,9 – 63,3 µg L⁻¹) e 49,3 µg L⁻¹ (46,6 – 52,1 µg L⁻¹), respectivamente; e para o difenoconazol e o Score 250EC® foram de 1,41 mg L⁻¹ (1,40 – 1,43 mg L⁻¹) e 1,66 mg L⁻¹, (1,64 – 1,68 mg L⁻¹) respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre a toxicidade isolada dos ingredientes ativos e suas respectivas formulações comerciais em testes agudos com peixes. Nos testes de toxicidade com as misturas dos ingredientes ativos, a partir de um design experimental fatorial e análise por modo de ação independente (IA) observou-se que a mistura de abamectina + difenoconazol promove um efeito tóxico sinérgico a peixes em exposições agudas. Observou-se também a ausência do mesmo efeito nas exposições com as misturas das formulações comerciais, que pode ser explicado pela ação dos aditivos inertes presentes nos compostos formulados. A avaliação de misturas de agrotóxicos, especialmente em países tropicais, e indicações para futuras pesquisas são discutidos.

Palavras-chave: Kraft 36EC®; Score 250EC®; pesticidas, misturas, *Danio rerio*.

1. Introdução

Os sistemas de produção agrícola em países tropicais geralmente são mais suscetíveis a pragas quando comparado a países temperados devido as condições ambientais favoráveis de proliferação de pragas e ervas daninhas (LEWIS et al., 2016). Desta forma, a intensificação da agricultura e a expansão das fronteiras agrícolas com o aumento do uso de agrotóxicos tem sido evidente na América Latina desde o final da década de 1990 (CARRIQUIRIBORDE et al., 2014). Neste processo, o Brasil tornou-se o maior consumidor de agrotóxicos do mundo em 2008, e atualmente é responsável por cerca de 20% do consumo total mundial (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (SANTOS, 2012), muitos dos agrotóxicos aprovados no Brasil são classificados como compostos altamente perigosos ao ambiente. Estes compostos podem apresentar mais efeitos tóxicos a organismos não alvos que os ingredientes ativos isolados devido principalmente aos diferentes modos de ação (MoA) dos inúmeros compostos aditivos presentes nas formulações comerciais, chamados pelos fabricantes de “compostos inertes”, como por exemplo surfactantes, emulsificantes, compostos nitrogenados, entre outros (COORS; FRISCHE, 2011; COX; SURGAN, 2006). Apesar de serem chamados de inertes sabe-se que estes compostos não são necessariamente química nem biologicamente inativos, pois muitas vezes elevam a toxicidade dos produtos formulados em relação aos princípios ativos por aumentar a absorção cutânea, a mobilidade do composto no ambiente, bem como sua persistência (COX; SURGAN, 2006).

Um fato que agrava mais esta situação de contaminação é que, em muitos casos, agrotóxicos são aplicados em misturas nas culturas agrícolas a fim de aumentar a eficácia dos produtos (JUNGHANS et al., 2006). Porém, a mistura destes compostos pode provocar efeitos aditivos ou sinérgicos drásticos em comunidades aquáticas não alvo (AXELRAD; HOWARD; MCLEAN, 2002; COORS; FRISCHE, 2011; DENEER, 2000; GATIDOU; STASINAKIS; IATROU, 2015; LOUREIRO et al., 2010).

Um exemplo de contaminação aquática causada por misturas de agrotóxicos ocorre no estado de Minas Gerais, na principal região produtora de morango do Brasil. O município de Bom Repouso, MG tem um clima tropical de altitude, e é uma área agrícola com uso intensivo de agrotóxicos (SILVA, 2016). Por meio de uma pesquisa de campo nessa área foi identificado que o inseticida/acaricida Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e o fungicida Score

250EC® (i.a. difenoconazol) são os principais agrotóxicos utilizados nesta área (MOREIRA et al., 2017; NUNES; ESPÍNDOLA, 2012).

A abamectina é uma ivermectina que atua bloqueando os receptores do ácido-gama-aminobutírico (GABA) em vertebrados e invertebrados (NOVELLI et al., 2016). O difenoconazol é um fungicida azol conhecido por agir interferindo na biossíntese do ergosterol em fungos levando a alterações na morfologia e funcionalidade da membrana celular fúngica (MU et al., 2016). Uma vez que ambos os agrotóxicos são intensivamente utilizados ao longo do ano nos cultivos de morango do Brasil, a presença da mistura destes compostos encontradas simultaneamente em corpos hídricos da região pode provocar maiores efeitos tóxicos para a vida aquática nestes ecossistemas do que os compostos individuais.

Apesar do intenso uso de agrotóxicos em países tropicais como a Brasil, há ainda relativamente pouco conhecimento sobre o destino, toxicidade e os efeitos das misturas destes compostos nos ecossistemas aquáticos tropicais (CARRIQUIRIBORDE et al., 2014; DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; LEWIS et al., 2016). Com isso, destaca-se a importância de investigar os efeitos tóxicos das novas formulações comerciais a organismos aquáticos não alvos, bem como os efeitos gerados pela exposição às misturas destes compostos (LEWIS et al., 2016; MOREIRA et al., 2017).

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda dos agrotóxicos Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e Score 250EC® (i.a. difenoconazol) a adultos de *Danio rerio* a fim de avaliar se a exposição dos organismos às formulações comerciais e às misturas são mais tóxicas quando comparadas aos ingredientes ativos puros e exposições isoladas, respectivamente.

Os objetivos específicos foram:

- Realizar testes de toxicidade aguda em laboratório utilizando adultos de *Danio rerio* expostos por 48h aos ingredientes ativos abamectina e difenoconazol e às formulações comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC® separadamente a fim de calcular as CL₅₀, 48h e avaliar se os compostos “inertes” presentes nas formulações comerciais influenciam no efeito tóxico dos ingredientes ativos puros;

- Realizar ensaios com as misturas dos compostos abamectina + difenoconazol e Kraft 36EC® + Score 250EC® a fim de avaliar o efeito tóxico provocado em adultos de *zebrafish* pelo uso simultâneo de agrotóxicos.

3. Material e métodos

3.1 Organismos teste e aclimação

Peixes adultos da espécie *Danio rerio* foram utilizados como organismos teste nos ensaios ecotoxicológicos e foram adquiridos em lotes homogêneos na Piscicultura São Matheus, localizada na cidade de São Carlos, SP, Brasil. Os organismos foram aclimatados com água reconstituída pH 7,0 – 7,6; dureza 40 – 48 mg L⁻¹ CaCO₃ L⁻¹ (água de diluição – ABNT/NBR 15088/2011) até o início dos experimentos em aquários de vidro de 90L, no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), localizado no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da Universidade de São Paulo (USP), Brasil. Os peixes foram mantidos sob aeração constante (oxigênio dissolvido > 6,0 mg L⁻¹), a 25°C ± 2,0°C, e em foto período de 12h claro-escuro. Os peixes foram alimentados diariamente na fase de aclimação com Tetramin® e durante os experimentos os peixes não foram alimentados. Seguindo recomendações da NBR 15088 (ABNT, 2016), realizou-se biometria com pelo menos 10% dos organismos de cada lote, bem como testes de sensibilidade com o sal de referência cloreto de potássio (KCl), a fim de avaliar as condições fisiológicas dos mesmos (APÊNDICE C – Aclimação, biometria e testes de sensibilidade com adultos de *Danio rerio*).

3.2 Testes de toxicidade

Os padrões de abamectina PESTANAL® (31732 Sigma-Aldrich - CAS: 71751-41-2), e de difenoconazol PESTANAL® (36531 Sigma-Aldrich - CAS: 119446-68-3) foram diluídos em acetona e, a partir das soluções estoques de 1 mg mL⁻¹ de abamectina e 10 mg mL⁻¹ de difenoconazol, foram realizadas cinco diluições para cada composto (20; 40; 60; 80 e 100 µg L⁻¹ de abamectina e 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg L⁻¹ de difenoconazol) utilizando como meio a água de diluição (ABNT/NBR 15088/2011).

As caldas do inseticida Kraft 36EC® (CHEMINOVA, 2014) e do fungicida Score 250EC® (SYNGENTA, 2017) foram preparadas de acordo com as concentrações recomendadas pelos fabricantes para os cultivos de morango (10,8 mg L⁻¹ de abamectina na

calda do Kraft 36EC® e 100 mg L⁻¹ de difenoconazol na calda do Score 250EC®) (CHEMINOVA, 2014; SYNGENTA, 2017). A partir das caldas preparadas em água destilada foram realizadas cinco diluições para cada formulação comercial, que para o Kraft 36EC® foi de 0,05; 0,19; 0,78; 3,12; e 12,5 % da calda inicial (o que corresponde a 5,4; 20,5; 84,2; 337 e 1350 µg L⁻¹ de abamectina no produto formulado) e para o Score 250EC® foi de 0,18; 0,37; 0,78; 1,5 e 3 % (o que corresponde a 0,18; 0,37; 0,78; 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ de difenoconazol), utilizando como meio a água de diluição (ABNT/NBR 15088/2011).

Os testes de toxicidade aguda foram realizados com adultos de *Danio rerio* expostos aos diferentes tratamentos por 48h nas mesmas condições físico-químicas descritas na fase de aclimação. Simultaneamente aos testes com os compostos isolados (abamectina, difenoconazol, Kraft 36EC® e Score 250EC®) foram realizados também testes com as misturas abamectina + difenoconazol e Kraft 36EC® + Score 250EC®. Utilizou-se um design experimental fatorial completo (Figura 1), em triplicata e em recipientes plásticos não tóxicos de 1L contendo três organismos cada (n=9) e respeitando-se a proporção de 1g de peixe para 1L de solução (ABNT/NBR 15088/2011).

Figura 1. 1 - Figura mostrando o design experimental fatorial completo utilizado nos experimentos com adultos de *Danio rerio* expostos às misturas dos ingredientes ativos abamectina + difenoconazol (A) e formulações comerciais Kraft 36EC® + Score 250EC® (B)

Foram realizadas todas as combinações possíveis entre as cinco concentrações utilizadas para o cálculo das CL₅₀ nos testes de toxicidade dos compostos isolados (design fatorial completo) além do controle e controle do solvente. No total, foram realizados 37 diferentes tratamentos nos testes com os ingredientes ativos (abamectina + difenoconazol) e as combinações estão detalhadas na Tabelas 1. Da mesma forma como foi feito com os princípios ativos, em um design fatorial completo foram combinadas todas as concentrações utilizadas nos testes isolados com as formulações comerciais (Kraft 36EC® + Score 250EC®), além de um controle, totalizando 36 tratamentos detalhados na Tabela 2.

Tabela 1. 1 - Combinações das concentrações utilizadas e volumes em μL da solução estoque adicionados de cada composto aos recipientes de 1L no teste de toxicidade da mistura abamectina + difenoconazol

Grupos	Abamectina ($\mu\text{g/L}$)	Difenoconazol ($\mu\text{g/L}$)	Volume da solução estoque de abamectina (μL)	Volume da solução estoque de difenoconazol (μL)	Mortalidade após 48h
1	0	0	0	0	0
2	0	0	100 acetona	250 acetona	0
3	20	0	20	0	0
4	40	0	40	0	1
5	60	0	60	0	5
6	80	0	80	0	9
7	100	0	100	0	9
8	0	500	0	50	0
9	0	1000	0	100	0
10	0	1500	0	150	8
11	0	2000	0	200	9
12	0	2500	0	250	9
13	20	500	20	50	5
14	20	1000	20	100	9
15	20	1500	20	150	9
16	20	2000	20	200	9
17	20	2500	20	250	9
18	40	500	40	50	9
19	40	1000	40	100	9
20	40	1500	40	150	9
21	40	2000	40	200	9
22	40	2500	40	250	9
23	60	500	60	50	9
24	60	1000	60	100	9
25	60	1500	60	150	9
26	60	2000	60	200	9
27	60	2500	60	250	9
28	80	500	80	50	9
29	80	1000	80	100	9
30	80	1500	80	150	9
31	80	2000	80	200	9
32	80	2500	80	250	9
33	100	500	100	50	9
34	100	1000	100	100	9
35	100	1500	100	150	9
36	100	2000	100	200	9
37	100	2500	100	250	9

Tabela 1. 2 - Combinações das concentrações e volumes de calda em μL de cada composto adicionados aos recipientes de 1L no teste de toxicidade com misturas de Kraft 36EC® + Score 250EC®

Grupos	Kraft 36EC® (%)	Score 250EC® (%)	Concentração de abamectina Kraft 36EC® ($\mu\text{g/L}$)	Concentração de difenoconazol Score 250EC® ($\mu\text{g/L}$)	Volume de Kraft 36EC® (mL)	Volume de Score 250EC® (mL)	Mortalidade após 48h
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0,05	0	5,4	0	0,5	0	0
3	0,19	0	20,5	0	1,9	0	1
4	0,78	0	84,2	0	7,8	0	7
5	3,12	0	337	0	31,2	0	9
6	12,5	0	1350	0	125	0	9
7	0	0,18	0	180	0	1,8	0
8	0	0,37	0	370	0	3,7	0
9	0	0,78	0	780	0	7,8	0
10	0	1,5	0	1500	0	15	1
11	0	3	0	3000	0	30	9
12	0,05	0,18	5,4	180	0,5	1,8	0
13	0,05	0,37	5,4	370	0,5	3,7	0
14	0,05	0,78	5,4	780	0,5	7,8	0
15	0,05	1,5	5,4	1500	0,5	15	9
16	0,05	3	5,4	3000	0,5	30	9
17	0,19	0,18	20,5	180	1,9	1,8	0
18	0,19	0,37	20,5	370	1,9	3,7	1
19	0,19	0,78	20,5	780	1,9	7,8	6
20	0,19	1,5	20,5	1500	1,9	15	9
21	0,19	3	20,5	3000	1,9	30	9
22	0,78	0,18	84,2	180	7,8	1,8	9
23	0,78	0,37	84,2	370	7,8	3,7	9
24	0,78	0,78	84,2	780	7,8	7,8	9
25	0,78	1,5	84,2	1500	7,8	15	9
26	0,78	3	84,2	3000	7,8	30	9
27	3,12	0,18	337	180	31,2	1,8	9
28	3,12	0,37	337	370	31,2	3,7	9
29	3,12	0,78	337	780	31,2	7,8	9
30	3,12	1,5	337	1500	31,2	15	9
31	3,12	3	337	3000	31,2	30	9
32	12,5	0,18	1350	180	125	1,8	9
33	12,5	0,37	1350	370	125	3,7	9
34	12,5	0,78	1350	780	125	7,8	9
35	12,5	1,5	1350	1500	125	15	9
36	12,5	3	1350	3000	125	30	9

3.3 Análises químicas de abamectina, difenoconazol e variáveis físico-químicas

As concentrações de abamectina e difenoconazol nas soluções estoques foram quantificadas a fim de confirmar as concentrações nominais dos testes. As análises foram realizadas em HPLC/MS/MS Agilent® 6490 series, utilizando a coluna Zorbax Eclipse plus C18 Agilent (fase móvel água - 0,1% ácido fórmico: acetonitrila = 10:90 V/V) e nebulizador ISI/MRM. Mais detalhes sobre a validação do método e quantificação dos compostos estão descritos no APÊNDICE D – Análises químicas da abamectina e do difenoconazol nas matrizes de água e solo. Algumas variáveis físico-químicas foram analisadas na água no início e no final dos experimentos como a temperatura (°C), pH (Mi-cronal B374 potentiometer) e oxigênio dissolvido (OD YSI meter), e as médias $\pm$ desvio padrão encontram-se no APÊNDICE C - Variáveis físico-químicas dos experimentos com adultos de *Danio rerio*.

3.4 Análise dos dados

A mortalidade foi observada e registrada após 48h e os valores de CL_{50} dos testes com os compostos isolados foram calculados no software Statistica 7.0 a partir do método de regressão não linear (*three-parameter logistic curve*). Diferenças entre os tratamentos foram analisadas por teste t. Dados de mortalidade dos testes de toxicidade com as misturas foram analisados baseado nos modelos de adição de concentração (CA) e ação independente (IA). Inicialmente, os dados de mortalidade foram comparados com os efeitos teóricos esperados das misturas calculados a partir das exposições individuais usando a ferramenta MIXTOX (JONKER et al., 2005). A partir dos modelos de referência, os desvios de interações sinérgicas/antagonistas (S/A), desvios da proporção da dose (DR) e desvios do nível da dose (DL) foram modelados pela adição dos parâmetros “a” e “b” (Tabela 3). O parâmetro “a” torna-se negativo e positivo em desvios sinérgicos e antagônicos, respectivamente. Para descrever o desvio do nível da dose (DL), outro parâmetro (b_{DL}) foi incluso além do parâmetro “a”. Em DL, o valor de “a” indica o desvio em alta e baixa doses e o valor de b_{DL} indica em que nível de dose o desvio altera. A Tabela 3 resume o significado dos parâmetros “a” e “b” e explica como os dados devem ser interpretados. Mais detalhes sobre as funções do desvio podem ser obtidos de Jonker et al. (2005). Os dados foram verificados para estes modelos conceituais e desvios, e o melhor ajuste foi escolhido através do método da máxima verossimilhança. Diferenças significativas foram consideradas com $p < 0,05$.

Tabela 1. 3 - Interpretação dos parâmetros “a” e “b” que definem os padrões de desvios dos modelos teóricos de ação independente (IA). Adaptado de Jonker et al. (2005)

Padrão de desvio	Parâmetro “a”	Parâmetro “b”
Sinergismo/antagonismo (S/A)	$a > 0$ - antagonismo $a < 0$ - sinergismo	
Proporção da dose (DR)	$a > 0$ - antagonismo, exceto para aquelas proporções de misturas onde um valor de b negativo significativo indica sinergismo $a < 0$ - sinergismo, exceto para aquelas proporções de misturas onde um valor de b positivo significativo indica antagonismo	$b_i > 0$ - antagonismo onde a toxicidade da mistura é principalmente causada pelo agente tóxico i $b_i < 0$ - sinergismo onde a toxicidade da mistura é principalmente causada por i
Nível da dose (DL)	$a > 0$ - antagonismo de dose baixa e sinergismo em doses altas $a < 0$ - sinergismo de dose baixa e antagonismo em doses altas	$b_{DL} > 2$ - alteração no nível de dose menor que EC_{50} $b_{DL} = 2$ - alteração em EC_{50} $1 < b_{DL} < 2$ - alteração no nível de dose maior que EC_{50} $b_{DL} < 1$ - sem alteração, mas a magnitude de S/A depende do nível de efeito

4. Resultados e discussão

4.1 Análises químicas de abamectina e difenoconazol e variáveis físico-químicas

Os valores nominais de abamectina e difenoconazol presentes nas caldas preparadas com o Kraft 36EC® e com o Score 250EC® foram confirmados e com 99% de confiança ($r = 0,998$) os limites de detecção e quantificação foram de 22,2 e 27,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, e o valor médio $\pm$ desvio padrão das recuperações é de $115 \pm 29\%$. Os testes foram realizados em laboratório climatizado e a temperatura média da água foi de $23,7 \pm 0,3$ °C. As médias no início e final dos experimentos dos parâmetros de pH foram de $7,6 \pm 0,2$ e $7,2 \pm 0,3$ respectivamente; e de oxigênio dissolvido foram de $7,2 \pm 0,2$ $\mu\text{g L}^{-1}$ e $5,4 \pm 0,6$ $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.2 Testes de toxicidade isolados: ingredientes ativos x formulações comerciais

Os resultados de CL_{50} , 48h obtidos em testes isolados para a abamectina e o Kraft 36EC® foram 58,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (53,9 – 63,3 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 49,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (46,6 – 52,1 $\mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente.

Para o difenoconazol e o Score 250EC®, os resultados de CL_{50} foram de $1,41 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,40 - 1,43 \text{ mg L}^{-1}$) e $1,66 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,64 - 1,68 \text{ mg L}^{-1}$) respectivamente. Estudos anteriores realizados com *Danio rerio* expostos aos princípios ativos abamectina e difenoconazol mostram valores próximos de $CL_{50} - 48\text{h}$ com as calculadas no presente estudo. Em Novelli et al. (2012a) a $CL_{50}, 48\text{h}$ para adultos de *Danio rerio* foi de 33 ug L^{-1} ($29,17 - 36,77 \text{ ug L}^{-1}$) de abamectina, e em Mu et al. (2013) a $CL_{50}, 48\text{h}$ para adultos de *Danio rerio* foi de $1,45 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,38 - 1,53 \text{ mg L}^{-1}$) de difenoconazol.

Sabe-se que fabricantes de agrotóxicos utilizam como ingredientes ativos compostos específicos de acordo com sua finalidade inseticida, fungicida, acaricida, etc. Além destes ingredientes são adicionados às formulações comerciais solventes, emulsificantes, compostos a base de bromo, cloro, enxofre, fósforo, nitrogênio e oxigênio a fim de melhorarem a eficácia e aumentarem o tempo de estocagem de seus produtos. Porém, os fabricantes de agrotóxicos não têm a obrigatoriedade de indicar na bula quantos e quais são estes aditivos “inertes” que compõem as formulações comerciais, pois são amparados legalmente por se tratar de uma informação de sigilo comercial (COORS; FRISCHE, 2011; COX; SURGAN, 2006). Por este motivo, pouco se sabe quais são estes compostos e os efeitos que as misturas dos diferentes ingredientes “inertes” presentes nas formulações comerciais de agrotóxicos podem causar a organismos não alvos.

Estudos realizados anteriormente mostram que algumas formulações comerciais são mais tóxicas a organismos não alvos devido à ação dos diferentes aditivos “inertes” (e.g. algumas formulações comerciais são até 100 vezes mais tóxicas que o ingrediente ativo glifosato). Estes “inertes” presentes nas formulações comerciais podem aumentar a absorção dos ingredientes ativos por organismos aquáticos e influenciar na toxicidade dos mesmos (COX; SURGAN, 2006). No atual estudo em que foram utilizadas as formulações comerciais de Kraft 36EC® e Score 250EC®, quando comparadas às toxicidades em relação às exposições com os respectivos ingredientes ativos, não foram observados efeitos significativos que potencializassem ou minimizassem a toxicidade dos compostos a adultos de peixes *Danio rerio* quando expostos isoladamente por 48h. Apesar de, neste caso, não terem sido observadas diferenças significativas na toxicidade entre os ingredientes ativos e suas respectivas formulações comerciais em testes agudos com peixes, o uso destes compostos no ambiente deve ser administrado com cautela, pois são compostos perigosos, extremamente tóxicos e que causam mortalidade a organismos não alvo a concentrações abaixo das que são lançadas no ambiente (MOREIRA et al., 2017; OLIVEIRA; BIANCHI; ESPÍNDOLA, 2018; SANCHES et al., 2017).

O Kraft 36EC® é um composto relativamente novo no mercado, e foi criado para substituir o composto Vertimec 18EC®. Os efeitos tóxicos do Vertimec 18EC® já estão bem descritos na literatura para diferentes organismos aquáticos e terrestres (BRAUN et al., 2012; CASALI-PEREIRA et al., 2015; NOVELLI et al., 2012b, 2016; VASCONCELOS et al., 2016), porém estudos envolvendo a nova formulação (Kraft 36EC®), que é duas vezes mais concentrada e que possivelmente apresenta aditivos “inertes” diferentes, ainda são escassos e necessários. Da mesma forma, faltam dados na literatura acerca de estudos ecotoxicológicos sobre os efeitos da formulação comercial Score 250EC® a organismos não alvo.

4.3 Toxicidade de misturas

Misturas de compostos tóxicos com modos de ação semelhantes são modulados por adição de concentração, enquanto que a modelo de ação independente IA é usado com misturas de compostos com diferentes modos de ação (JONKER et al., 2005; LOUREIRO et al., 2010). Os resultados dos testes de toxicidade das misturas dos princípios ativos abamectina + difenoconazol e dos produtos comerciais Kraft36EC® + Score250EC® foram obtidos a partir do tratamento dos dados utilizando o método IA realizados no MIXTOX, a fim de verificar efeitos sinérgicos ou antagônicos provocados pelas misturas do inseticida e do fungicida. O padrão de toxicidade foi deduzido diretamente dos valores dos parâmetros e o desvio máximo foi calculado em termos de nível de efeito (FREITAS et al., 2014; JONKER et al., 2005). Todos os parâmetros nos testes com as misturas dos ingredientes ativos e formulações comerciais encontram-se na Tabela 4.

Como previsto, os dados de toxicidade da mistura abamectina + difenoconazol se encaixaram no modelo IA produzindo uma soma dos quadrados dos resíduos (SS) de 71,92 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,29$; Tabela 4). Nos gráficos da Figura 2 podem-se observar as plotagens dos dados de CL_x modelados x CL_x reais obtidos na planilha MIXTOX. Nesta plotagem, à esquerda, é possível observar claramente a predominância do efeito sinérgico nas exposições de adultos de *Danio rerio* às misturas dos ingredientes ativos. Pode-se observar também este mesmo efeito pelas linhas côncavas do isobole plotado no gráfico à esquerda da Figura 3. Este efeito sinérgico mostra que, quando em misturas, os compostos testados potencializam os efeitos tóxicos causados aos organismos teste. Estas observações visuais também são confirmadas com a análise, pois após a adição dos parâmetros “a” e “b” para o modelo IA, o desvio sinérgico foi de fato observado em S/A, como pode ser deduzido da diminuição do valor de SS para 47,90 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,53$; Tabela 4) e valor de $a < 0$.

Tabela 1. 4 - Sumário das análises dos testes de toxicidade aguda utilizando como organismo teste adultos de *Danio rerio* expostos às misturas de abamectina + difenoconazol e Kraft 36EC® + Score250EC®

	Ingredientes ativos					Formulações comerciais			
	IA	S/A	DR	DL		IA	S/A	DR	DL
max	0,98	0,98	0,98	0,98	max	0,99	0,99	0,99	0,98
β Abamectina	2,68	3,70	0,98	9,39	β Kraft 36EC®	1,37	1,31	1,31	3,95
β Difenoconazol	9,11	9,15	9,39	11,96	β Score250EC®	6,33	6,33	6,33	9,49
CL ₅₀ Abamec	0,03	0,03	11,96	0,06	CL ₅₀ Kraft 36EC®	7,57	7,59	7,59	58,59
CL ₅₀ Difeno	1,05	1,11	0,06	1,23	CL ₅₀ Score250EC®	1744,12	1744,12	1744,12	1791,79
a	-	-13,37	1,24	-9,00	a	-	0,009	0,009	324,17
b _{DR/DL}	-	-	-12,42	0,19	b _{DR/DL}	-	-	0,009	64,92
SS	71,92	47,90	45,68	46,42	SS	128,05	126,24	126,20	8,49
r^2	0,29	0,53	0,55	0,54	r^2	0,56	0,56	0,56	0,97
χ^2 ou test F	29,75	24,02	2,22	1,48	χ^2 ou test F	161,75	1,81	1,85	119,56
df	-	1	1	1	df	-	1	2	2
p (χ^2 / F)	$5,5 \times 10^{-6}$	$9,5 \times 10^{-7}$	0,14	0,22	p (χ^2 / F)	$6,15 \times 10^{-34}$	0,18	0,40	$1,09 \times 10^{-26}$

max é o valor de resposta máxima; β é o decline da curva de resposta do químico individual; CL₅₀ é a concentração letal média; a, b_{DR} e b_{DL} são parâmetros da função; SS é a soma dos resíduos quadrados; r^2 é o coeficiente de regressão; χ^2 ou Teste F é o teste estatístico; df é o grau de liberdade; e p (χ^2 / F) é o nível de significância do teste estatístico. IA é o modelo da ação independente, S/A é o desvio de sinergismo ou antagonismo, DR é o desvio dependente da proporção da dose e DL é o desvio dependente do nível da dose.

Figura 1. 2 - Gráficos das CL_x modeladas x CL_x reais. À esquerda o efeito sinérgico na exposição de *Danio rerio* às misturas dos ingredientes ativos abamectina + difenoconazol e à direita os efeitos provocados pelas misturas dos produtos comerciais

Figura 1. 3 - Isoboles plotados pelas exposições de adultos de *Danio rerio* expostos às misturas dos princípios ativos abamectina + difenoconazol (esquerda) e das formulações comerciais Kraft36EC® + Score250EC® (direita)

Nos resultados obtidos a partir das exposições realizadas utilizando às misturas das formulações comerciais Kraft36EC® + Score250EC® o mesmo efeito sinérgico não foi observado.

Os dados se encaixaram no modelo IA testado produzindo uma soma dos quadrados dos resíduos (SS) de 128,05 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,56$; Tabela 4). Porém, após a adição dos parâmetros “a” e “b”, não foram observados desvios significativos no modelo S/A (SS de 126,24; $p > 0,05$; $r^2 = 0,56$) nem no DR (SS 126,20; $p > 0,05$; $r^2 = 0,56$). Para o desvio DL (SS de 8,49; $p < 0,05$; $r^2 = 0,97$), os valores de $a > 0$ e $b_{DL} > 2$ sugerem antagonismo em baixas doses e sinergismo em altas com alteração de efeito abaixo do valor de CL_{50} . Apesar do valor de p significativo para este desvio dependente do nível da dose, o efeito observado não se torna evidente a partir dos gráficos. À direita da Figura 2, no gráfico plotado das CL_x modeladas x CL_x reais, pode-se

observar que os efeitos provocados pelas misturas dos produtos comerciais não parecem efetivamente serem potencializados nem minimizados. O mesmo ocorre na Figura 3 a partir do isobole à direita plotado onde podem ser observadas muitas linhas. Apesar de seguirem um mesmo padrão com tendência de algumas linhas mais acentuadas de antagonismo em baixas concentrações e sinergismo em altas, não fica evidente a confirmação desse padrão de resposta em peixes pela ação das misturas dos compostos comerciais.

Ao contrário dos mamíferos, a abamectina pode atravessar a barreira hematoencefálica em peixes e causar toxicidade (HOY; HORSBERG; NAFSTAD, 1990). Abamectina é conhecida por atuar sobre os receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) em invertebrados e vertebrados, e também em receptores glutamatérgicos nos canais de cloreto de invertebrados (NOVELLI et al., 2016). Depois da exposição à abamectina, o aumento de íons cloreto hiperpolariza as células nervosas e musculares interferindo na transmissão neuromuscular e levando à morte (CAMPBELL, 1989). O difenoconazol é um fungicida triazol e é conhecido por atuar interferindo na biossíntese do ergosterol em fungos pela inibição da desmetilação C-14 dos esteróis, o que leva a alterações morfológicas e funcionais da membrana celular fúngica (DAR, 2006). Porém, no relatório da União Europeia é discutido que o efeito tóxico do difenoconazol em peixes parece não ser resultado de algum modo de ação específico a não ser pela toxicidade geral sistêmica (DAR, 2006).

Efeitos tóxicos de misturas incluem aspectos da toxicocinética e da toxicodinâmica. Por isso é necessário avaliar as toxicidades intrínsecas relativas às espécies e aos compostos a fim de esclarecer os mecanismos e entender os efeitos observados (LOUREIRO et al., 2010). Após revisão de estudos de toxicidade com misturas concluiu-se que as interações sinérgicas envolvendo fungicidas azóis são provavelmente exemplos de casos em que a metabolização dos agrotóxicos são inibidos pelo azol (JAGER; GUDMUNDSDÓTTIR; CEDERGREEN, 2014). Os fungicidas azóis são conhecidos inibidores de uma variedade de monooxigenases P450, que são enzimas responsáveis pela metabolização da fase I de compostos lipofílicos, juntamente com uma série de processos de biossíntese de plantas e animais (GUENGERICH, 2008; WALKER, 2009). Consequentemente, a toxicidade de inseticidas é frequentemente potencializada quando misturados com fungicidas azóis, como foi observado no presente estudo (JAGER; GUDMUNDSDÓTTIR; CEDERGREEN, 2014; RASMUSSEN et al., 2012).

Com relação à diferença no padrão de resposta tóxica entre as misturas de ingredientes ativos e das formulações comerciais, a ação dos diferentes aditivos “inertes” presentes no Kraft 36EC® e no Score 250EC® pode ter influenciado no efeito tóxico sinérgico observado na exposição às misturas dos ingredientes ativos puros. De alguma forma, os compostos

inertes influenciam no mecanismo de ação da mistura abamectina + difenoconazol, na absorção dos compostos pelos organismos ou até mesmo na degradação e biodisponibilidade dos mesmos. Após uma busca na literatura para melhor explicar os resultados e encontrar dados semelhantes aos nossos em que aditivos inertes minimizam o efeito tóxico sinérgico de misturas observou-se que há uma escassez de dados sobre o efeito tóxico de misturas complexas de agrotóxicos, o que ressalta a importância do presente estudo. Sendo assim, estudos futuros devem ser conduzidos para melhor explicar esta questão.

5. Conclusão

Os produtos comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC® testados não promovem maior mortalidade significativa a organismos aquáticos não alvos quando comparados a seus princípios ativos abamectina e difenoconazol em exposições isoladas. Apesar dos diferentes “aditivos inertes” estarem presentes nas formulações comerciais, os mesmos parecem não influenciarem no efeito tóxico dos ingredientes ativos a peixes. Conclui-se também que, quando utilizados simultaneamente, os princípios ativos abamectina e difenoconazol geram um efeito deletério sinérgico em peixes, pois a exposição destes organismos a esta mistura provoca maior letalidade em *Danio rerio*. Em exposições agudas, os compostos inertes presentes nas formulações de Kraft36EC® e Score250EC® parecem modificar o efeito tóxico sinérgico observado em peixes expostos às misturas de abamectina e difenoconazol. Mais estudos sobre esse assunto precisam ser conduzidos para que sejam compreendidos os mecanismos de ação de compostos complexos e misturas.

REFERÊNCIAS

- ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes**, 2016.
- ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.
- AXELRAD, J. C.; HOWARD, C. V.; MCLEAN, W. G. Interactions between pesticides and components of pesticide formulations in an in vitro neurotoxicity test. **Toxicology**, v. 173, n. 3, p. 259–268, 2002.
- BRAUN, A. et al. Ecotoxicological effects of Vertimec® 18EC on plankton. **Journal of the**

Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 7, n. 2, p. 23–29, 2012.

CAMPBELL, W. **Ivermectin and Abamectin**. Nova Iorque: Springer, 1989.363p.

CARRQUIRIBORDE, P. et al. Aquatic risk assessment of pesticides in Latin America. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 10, n. 4, p. 539–542, 2014.

CASALI-PEREIRA, M. P. et al. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v. 139, n. October, p. 558–564, 2015.

CHEMINOVA. **KRAFT 36EC®**. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/kraft.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

COORS, A.; FRISCHE, T. Predicting the aquatic toxicity of commercial pesticide mixtures. **Environmental Sciences Europe**, v. 23, n. 1, p. 1–18, 2011.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803–1806, 2006.

DAAM, M. A.; VAN DEN BRINK, P. J. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 24–37, 2010.

DAR. **Draft Assessment Report (DAR) e Public Version e Initial Risk Assessment provided by the Rapporteur Member State Sweden for the Existing Active Substance Difenconazole of the Third Stage (Part A) of the Review Programme Referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC**. European Commission. 2006. 100p.

DENEER, J. W. Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. **Pest Management Science**, v. 56, n. 6, p. 516–520, 2000.

FREITAS, E. C. et al. Can mixtures of cyanotoxins represent a risk to the zooplankton? The case study of *Daphnia magna* Straus exposed to hepatotoxic and neurotoxic cyanobacterial extracts. **Harmful Algae**, v. 31, p. 143–152, 2014.

GATIDOU, G.; STASINAKIS, A. S.; IATROU, E. I. Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. **Chemosphere**, v. 119, p. S69–S74, 2015.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. Table 1, p. 70–83, 2008.

HOY, T.; HORSBERG, T. E.; NAFSTAD, I. The disposition of ivermectin in Atlantic Salmon (*Salmo solar*). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 67, n. 4, p. 307–312, 1990.

JAGER, T.; GUDMUNDSDÓTTIR, E. M.; CEDERGREEN, N. Dynamic modeling of sublethal mixture toxicity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 12, p. 7026–7033, 2014.

JONKER, M. J. et al. Significance Testing of Synergistic / Antagonistic , Dose Level – Dependent , or Dose Ratio – Dependent Effects in Mixture Dose – Response Analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2701–2713, 2005.

JUNGHANS, M. et al. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 93–110, 2006.

LEWIS, S. E. et al. Pesticide Behavior, Fate, and Effects in the Tropics: An Overview of the Current State of Knowledge. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 20, p. 3917–3924, 2016.

LOUREIRO, S. et al. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: Comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1716–1726, 2010.

MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58–66, 2017.

MU, X. et al. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 147–157, 2013.

MU, X. et al. The developmental effect of difenoconazole on zebra fish embryos: A mechanism research. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 18–26, 2016.

NOVELLI, A. et al. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 36–40, 2012a.

NOVELLI, A. et al. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec®18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, n. 1, p. 87–93, 2012b.

NOVELLI, A. et al. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec®18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1408–1414, 2016.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 1063–1071, 2012.

OLIVEIRA, V. B. M.; BIANCHI, M. O.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Hazard assessment of the pesticides KRAFT 36 EC and SCORE in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9999, n. 9999, p. 1–6, 2018.

RASMUSSEN, J. J. et al. Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders. **Aquatic Toxicology**, v. 118–119, p. 54–61, 2012.

SANCHES, A. L. M. et al. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, p. 582–587, 2017.

SANTOS, M. M. DOS. **Avaliação de risco ambiental de agrotóxicos no Ibama**. Disponível em: <http://ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/avaliacao/2017/2017-07-25-avaliacao_risco_ambiental_agrotoxicos_ibama_2012-ARA.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2018.

SILVA, M. R. **Gestão de embalagens de agrotóxicos - logística reversa em pequenos municípios brasileiros: o caso do município de Bom Repouso, MG**. (Dissertação de mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

SYNGENTA. **SCORE** ®. Disponível em: <https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/score_1.pdf?token=1511171921>. Acesso em: 19 fev. 2018.

VASCONCELOS, A. M. et al. Acute and chronic sensitivity, avoidance behavior and sensitive life stages of bullfrog tadpoles exposed to the biopesticide abamectin. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 500–509, 2016.

WALKER, C. H. **Factors determining the toxicity of organic pollutants to animals and plants**. In: **Organic Pollutants**. London: CRC Press, 2009.

Capítulo 2

Estudo comparativo dos efeitos tóxicos gerados em embriões e adultos de peixes *Danio rerio* expostos ao inseticida Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e ao fungicida Score 250EC® (i.a. difenoconazol)

Ana Letícia Madeira Sanches ^a, Michiel Adriam Daam ^{a, b}, Aline Andrade Godoy ^c, Gabriela Meirelles ^a, Emanuela Cristina Freitas ^a, Inês Domingues ^d, Evaldo Luiz Gaeta Espíndola ^a

^a NEEA/CRHEA/SHS, Escola de Engenharia de São Carlos, Av. Trabalhador São Carlense, 400, 13.560-970 São Carlos, Brasil

^b CENSE, Departamento de Engenharia e Ciências Ambientais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal

^c Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

^d Departamento de Biologia Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

RESUMO

O uso de peixes como organismos teste destaca-se na ecotoxicologia em função de sua representatividade ecológica nos ecossistemas aquáticos. No entanto, devido às questões éticas, aliado à redução de custos, otimização de espaço e geração de resíduos, o uso de indivíduos adultos vem sendo substituído por métodos alternativos, como o FET (*Fish Embryo Toxicity Test*), que é um exemplo de teste padronizado utilizando embriões de *Danio rerio*. Porém, estudos mostram que a sensibilidade dos diferentes estágios de vida dos organismos depende das características dos compostos e de suas interações, e como ainda pouco se sabe sobre as causas dessas diferenças na sensibilidade, e para melhor entender a toxicocinética dos diferentes compostos, é recomendado que a toxicidade dos químicos seja avaliada em embriões, jovens e/ou adultos. Considerando os riscos ecológicos inerentes ao uso do inseticida abamectina e do fungicida difenoconazol, o objetivo principal desta pesquisa foi avaliar o efeito destes agrotóxicos, isolados e em mistura, em embriões de *Danio rerio* comparando estes resultados com a sensibilidade obtida para adultos de *Danio rerio*. Dos efeitos gerados pelos compostos isolados aos embriões de *Danio rerio* foram observados mortalidade, atraso na eclosão dos ovos e aumento na ocorrência de edemas. Nos ensaios de comportamento utilizando concentrações subletais dos compostos verificou-se que a exposição dos organismos aos agrotóxicos afetou a capacidade de natação das larvas após 120h de vida/exposição. Na exposição dos embriões às misturas binárias de Kraft 36EC® e Score 250EC® registrou-se efeito antagônico nas baixas concentrações e efeito sinérgico nas mais altas. Constatou-se, ainda, que os indivíduos adultos de *Danio rerio* foram mais sensíveis ao Kraft 36EC® (abamectina) do que os embriões, não existindo diferença de sensibilidade quando estes foram expostos ao Score 250EC®.

Palavras-chave: zebrafish, FET, formulações comerciais, agrotóxicos.

1. Introdução

Os peixes são organismos teste amplamente utilizados em avaliações de riscos ambientais e na ecotoxicologia em geral, por desempenharem um papel importante nas redes alimentares aquáticas, uma vez que participam da regulação de fluxo de nutrientes e energia (LAMMER et al., 2009). Entre as espécies utilizadas para avaliar os efeitos tóxicos de xenobióticos no ecossistema aquático, tem sido recomendada a espécie *Danio rerio* (zebrafish) como organismo teste modelo. Esta espécie é muito utilizada na ecotoxicologia devido à sua representatividade e similaridade genética com humanos, além de possuírem curto ciclo de vida (0h – ovos; 48h – embriões; 2 a 3 dias – larva; 30 a 90 dias - juvenis; acima de 2 anos – adultos), tamanho reduzido, boa capacidade de reprodução, fertilização externa, rápido desenvolvimento embrionário (48h), fácil obtenção de ovos, os quais são transparentes permitindo a visualização do desenvolvimento embrionário, além de não aderentes e de fácil manuseio (Figura 1) (KIMMEL et al., 1995; MU et al., 2013).

Figura 2. 1 - Principais estágios de vida da espécie *Danio rerio*: ovos, larva e organismo adultos

Além dos diversos testes já padronizados mundialmente com peixes na ecotoxicologia, novas metodologias surgiram nos últimos anos em defesa da sustentabilidade, contribuindo para redução de custos, otimização de espaço e redução de resíduos. De forma adicional à sustentabilidade, questões éticas acerca do uso de animais em pesquisa têm levado alguns pesquisadores a evitarem os testes que utilizam animais em estágios de vida mais desenvolvidos (BELANGER; RAWLINGS; CARR, 2013; DOMINGUES et al., 2010; LAMMER et al., 2009; MU et al., 2015).

Como método alternativo, o FET – *Fish Embryo Toxicity Test* foi desenvolvido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD TG 236, trazendo normas padronizadas de testes ecotoxicológicos utilizando embriões de *Danio rerio*. Nesta metodologia, ovos de *Danio rerio* recém-fertilizados são utilizados em exposições aos compostos químicos por um período de 96h, sendo que a cada 24h são observados quatro indicadores de letalidade: coagulação dos ovos fertilizados, formação dos somitos, ausência de desprendimento da cauda do saco vitelino e ausência de batimentos cardíacos. Após o

período de 96h, a toxicidade aguda é determinada com base nos indicadores observados e a CL_{50} é calculada. O desenvolvimento embrionário do *Danio rerio* é similar ao de vertebrados mais evoluídos, incluindo os humanos, além de ser rápido e facilmente monitorado devido ao ovo ser transparente (OECD, 2013).

O FET tem sido considerado uma metodologia mais ética e de menor custo quando comparada com os ensaios com peixes adultos (MU et al., 2015). Muitos trabalhos publicados utilizando o FET mostram resultados satisfatórios com uma variedade de substâncias químicas e diferentes modos de ação, solubilidade e volatilidade (BELANGER; RAWLINGS; CARR, 2013; LAMMER et al., 2009). Em um artigo de revisão, Lammer et al. (2009) avaliou a viabilidade da metodologia FET, comparando seus resultados com os testes tradicionais de toxicidade aguda utilizando organismos adultos, por meio de análises estatísticas de correlações. Neste estudo foram levantados dados de testes realizados com quase 150 substâncias diferentes, e concluiu-se que, em geral, o FET promove suporte científico relevante, podendo substituir os testes de toxicidade com adultos.

Porém, alguns estudos realizados com determinados compostos químicos, como alguns tipos de avermectinas e o difenoconazol, mostram limitações em tornar o FET um teste preditivo e substituto dos testes com adultos (DOMINGUES et al., 2010; MU et al., 2013). Uma das limitações em substituir testes com adultos de *Danio rerio* pelo FET seria a presença do cório, que atuaria como uma possível barreira na exposição ao químico, diminuindo assim a toxicidade. Outra limitação é a de que os embriões não possuem um completo desenvolvimento metabólico, como os organismos adultos, podendo também influenciar na toxicidade (MU et al., 2013). Sabe-se também que testes com embriões utilizando compostos de alto peso molecular e substâncias neurotóxicas são menos sensíveis quando comparados aos testes com indivíduos adultos (BRAUNBECK et al., 2015).

Em geral, agrotóxicos são os compostos menos testados em estudos ecotoxicológicos apesar de serem considerados os mais tóxicos dentre outros químicos (metais, polímeros, surfactantes, aditivos, etc) (BELANGER; RAWLINGS; CARR, 2013). Entre diversos agrotóxicos, o inseticida Kraft 36EC® (i. a. abamectina) e o fungicida Score 250EC® (i.a. difenoconazol) vem sendo amplamente utilizados nas culturas de morango no Brasil (SILVA, 2016), apesar de ambos serem compostos considerados extremamente tóxicos e muito perigosos ao meio ambiente (CHEMINOVA, 2014; SYNGENTA, 2017). Alguns estudos foram realizados com embriões de *Danio rerio* expostos isoladamente a ivermectinas (composto do mesmo grupo químico da abamectina) e ao fungicida difenoconazol (DOMINGUES et al., 2016; MU et al., 2013, 2015, 2016; OLIVEIRA et al., 2016), não sendo

encontradas informações sobre os efeitos gerados pela exposição de embriões de *Danio rerio* à mistura binária de abamectina e difenoconazol. Desta forma, não se conhece o real efeito causado aos embriões quando estes são expostos às misturas destes agrotóxicos.

Devido às incertezas de quais interações ocorrem entre os compostos e de seus diferentes modos de ação, em testes com misturas, recomenda-se avaliar os efeitos dos compostos químicos nos diferentes níveis biológicos organizacionais, a fim de identificar o nível mais sensível (SCHEIL et al., 2009). Sendo assim, estudos comparativos entre FET e testes com juvenis e/ou adultos são recomendados para melhor compreender os efeitos gerados, garantindo a segurança e confiabilidade no método (BELANGER; RAWLINGS; CARR, 2013).

2. Objetivos

O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar os efeitos tóxicos gerados em embriões de *Danio rerio* expostos as formulações comerciais dos praguicidas Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e Score 250EC® (i.a. difenoconazol), isolados e em misturas, pela avaliação de diferentes *endpoints*, a fim de comparar os resultados com a sensibilidade de testes previamente realizados utilizando adultos de *Danio rerio*.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar os efeitos tóxicos gerados em embriões de *Danio rerio* expostos isoladamente e às misturas binárias dos pesticidas Kraft 36EC® e Score 250EC®, por meio da análise de indicadores de letalidade, a fim de calcular as CE₅₀ e CL₅₀ de cada composto e verificar se ocorrem efeitos antagônicos, aditivos ou sinérgicos nas exposições em misturas;
- Avaliar os efeitos no comportamento (distância percorrida) em larvas de *Danio rerio*, após 120h de exposição, em concentrações subletais dos pesticidas Kraft 36EC® e Score 250EC®;
- Comparar as diferenças na sensibilidade de dois estágios de vida do *Danio rerio* (embriões e adultos) expostos aos pesticidas Kraft 36EC® e Score 250EC®, isolados e em misturas, a fim de identificar o estágio de vida mais sensível do organismo teste.

3. Material e métodos

3.1 Praguicidas

O produto comercial Kraft 36EC®, princípio ativo - abamectina, é um inseticida acaricida do grupo das avermectinas e o Score 250EC®, princípio ativo – difenoconazol, é um fungicida sistêmico do grupo triazol, sendo ambos aplicados nas culturas de algodão, citros, batata e morango. São compostos líquidos e estáveis à temperatura ambiente, e são classificados como muito tóxicos e considerados muito perigosos ao meio ambiente (CHEMINOVA, 2014; SYNGENTA, 2017). Estudos anteriores relataram efeitos negativos provocados por esses compostos a diferentes organismos terrestres e aquáticos, como anelídeos, cladóceros, anfíbios e peixes, mostrando o impacto ambiental negativo gerado pelo uso desses praguicidas e a importância de se aprofundar os estudos acerca desses compostos (MOREIRA et al., 2017; NOVELLI et al., 2012, 2016; NUNES; ESPÍNDOLA, 2012; OLIVEIRA; BIANCHI; ESPÍNDOLA, 2018; SANCHES et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2016). Os produtos comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC® utilizados foram obtidos comercialmente no Brasil em lojas de insumos agrícolas.

3.2 Organismos teste

Embriões de *Danio rerio* foram usados como organismo teste neste estudo. Os embriões foram obtidos do cultivo já estabelecido e estável do laboratório Zebrafish Facility, do Departamento de Biologia, da Universidade de Aveiro, Portugal. A água utilizada no cultivo e em todos os experimentos foi obtida e mantida pelo sistema de recirculação ZebTEC (Tecniplast), onde parâmetros físico-químicos são regulados e monitorados periodicamente pelo equipamento. O fotoperíodo foi de 16:8h, a temperatura foi mantida a $26 \pm 1,0$ °C, com pH de $7,5 \pm 0,5$, condutividade a $750 \pm \mu\text{S}$ e saturação de 95% de oxigênio dissolvido. Nitrito, nitrato e amônia foram monitorados. Os peixes adultos foram alimentados duas vezes ao dia com ração ZM-400 (Zebrafish Management Ltd). Machos e fêmeas sexualmente maduros e saudáveis foram selecionados para reprodução dos ovos.

O desenvolvimento embrionário do *Danio rerio* é rápido e pode ser facilmente observado por possuir ovos transparentes. Durante o período de zero a 0,7h pode ser observado o ovo recém-fertilizado até o primeiro ciclo celular chamado zigoto (Figura 2A); de 0,75 a 2,25h ocorre a clivagem (Figura 2B); de 2,25 a 5,25h pode ser observado a blástula (Figura 2C); de 5,25 a 10,33h a gástrula (Figura 2D); e de 10,33 a 24h começa a segmentação

(Figura 2E). Neste momento os somitos, as primeiras mobilidades e cauda começam a aparecer. A partir de 24h até 48h começam a desenvolver barbatanas, pigmentação e o corpo começa a esticar (Figura 2F), e de 48 a 72h ocorre a eclosão da larva jovem (Figura 2G).

Figura 2. 2 - Desenvolvimento embrionário do *Danio rerio* durante o período de 0h após a fertilização até 72h em que ocorre a eclosão da larva jovem. Adaptado de Kimmel et al., 1995

A coagulação dos ovos, alterações na formação dos somitos, desprendimento da cauda, batimentos cardíacos, atrasos na eclosão dos ovos, formação de edemas e a taxa de letalidade das larvas após 96h de exposição são os indicadores usualmente utilizados para calcular as CL_{50} e CE_{50} dos compostos (KIMMEL et al., 1995).

3.3 Exposições isoladas ao Kraft 36EC® e ao Score 250EC® - FET

Os Testes de Toxicidade Aguda em Embriões de Peixes (*Fish Embryo Acute Toxicity Test* - FET) utilizando o zebrafish (*Danio rerio*) foram realizados seguindo as normas estipuladas pela OECD TG 236 (OECD, 2013). No método FET, ovos de *Danio rerio* recém-fertilizados foram utilizados em exposições aos compostos químicos por um período de 96h. Os embriões foram expostos a pelo menos cinco diferentes concentrações do Kraft 36EC® e cinco do Score 250EC® em microplacas de 24 poços. Utilizou-se uma placa por tratamento, totalizando seis placas para cada composto (controle + 5 concentrações). Seguindo recomendações da OECD TG 236 cada tratamento obteve um n=20 (um ovo por poço) e foram realizados controles internos em todas as microplacas (Figura 3).

Figura 2. 3 - Design experimental dos ensaios FET realizados nas exposições dos embriões expostos aos compostos Kraft 36EC® e ao Score 250EC® separadamente a fim de obter a CL_{50} de cada composto. C i = controle interno

Os embriões foram dispostos individualmente nos poços contendo 2 mL da solução estoque de cada tratamento. A partir de resultados obtidos pelo grupo em estudos anteriores sabe-se que as CL_{50} , 96h do Kraft 36EC® e do Score 250EC® para o *Danio rerio* na fase adulta é de $59 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,41 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente (SANCHES et al., 2017). Tendo como base as CL_{50} obtidas nos testes com os organismos adultos, foram realizados testes preliminares com os embriões de zebrafish a fim de encontrar a melhor faixa de concentração para as exposições dos ovos aos pesticidas. Por fim, as concentrações utilizadas foram as mesmas para ambos compostos: 0,5; 1,1; 2,42; 5,32 e $11,7 \text{ mg L}^{-1}$ de abamectina e difenoconazol nas soluções de Kraft 36EC® e Score 250EC®, respectivamente. A cada 24h foram observados alguns indicadores como a coagulação dos ovos fertilizados, formação dos somitos, ausência de desprendimento da cauda do saco vitelino e ausência de batimentos cardíacos, atraso na eclosão do ovo e aumento na ocorrência de edemas. Após o período de 96h, a toxicidade aguda foi determinada com base nos indicadores observados e as CE_{50} e CL_{50} foram calculadas.

3.4 Exposições às misturas de Kraft 36EC® e Score 250EC®

Após realizadas as exposições isoladas, os embriões foram expostos as misturas binárias dos pesticidas Kraft 36EC® e Score 250EC®. As concentrações utilizadas foram de 0,5; 1,1; 2,4; 5,3 e $11,7 \text{ mg L}^{-1}$ de abamectina nas soluções de Kraft 36EC® e 0,2; 0,5; 1,0; 2,3 e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de difenoconazol nas soluções de Score 250EC®. Utilizou-se o design fatorial combinando todas as concentrações possíveis conforme mostra a Figura 4. No total foram realizados 35 tratamentos mais o controle.

Figura 2. 4 - Design experimental fatorial mostrando todas as combinações realizadas nas exposições dos embriões às misturas binárias de Kraft 36EC® e Score 250EC®

As exposições foram realizadas em placas de Petri de 50 mm, utilizando-se três placas por tratamento. Em cada placa, contendo 15mL de solução, foram dispostos 5 ovos totalizando um n=15 (Figura 5).

Figura 2. 5 - Design experimental do ensaio realizado com embriões de *Danio rerio* expostos às misturas binárias de Kraft 36EC® e Score 250EC®. No total foram realizados 36 tratamentos, com três placas para cada tratamento, contendo cinco ovos em cada placa (n=15)

Devido à grande quantidade de placas e ovos, os mesmos foram observados diariamente a olho nu e os coagulados foram retirados das placas a fim de evitar fungos. A taxa de coagulação/morte foi anotada em 24, 48, 72 e 96h e atrasos na eclosão dos ovos foram observados após 72, 96h e 120h. Os dados foram analisados no MIXTOX para avaliar o efeito gerado (JONKER et al., 2005). Maiores informações sobre o método e os parâmetros utilizados na análise estão descritos no Capítulo 1.

3.5 Análise de comportamento

Foram realizados testes de comportamento com os organismos submetidos a concentrações subletais dos compostos Kraft 36EC® e Score 250EC®.

Com o auxílio do equipamento Zebrabox, após 120h de exposição e durante 20 minutos, foi monitorada a distância total percorrida pelas larvas de *Danio rerio* expostas a diferentes concentrações subletais de cada composto, variando-se as condições de claro e escuro a cada cinco minutos. As concentrações subletais utilizadas foram 1,7; 3,7; 8,3; 18,1; 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de abamectina na solução de Kraft 36EC® e 47; 103,3; 227,3; 500 e 1100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de difenoconazol na solução de Score 250EC®. A leitura foi realizada em microplacas de 96 poços, onde cada poço recebeu 250 μL das soluções contendo as diferentes concentrações e um ovo recém fertilizado de *Danio rerio* por poço. Após 120h, as larvas já estão fora dos ovos e com bexiga natatória formada, permitindo a medida da distância total percorrida pelos organismos.

3.6 Análises químicas dos compostos

Análises químicas de quantificação da abamectina e do difenoconazol nas soluções estoque de Kraft 36EC® e de Score 250EC®, respectivamente, foram realizadas pela empresa contratada SAGILAB, localizada na cidade do Porto, Portugal. Os métodos de quantificação foram por LC/MS/MS, com limite de detecção de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de abamectina, e por ID-LC/MS/MS, com limite de detecção de 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ de difenoconazol. Os relatórios enviados pela empresa mostraram uma recuperação de 115,7 % na análise da abamectina e 115,0 % na análise do difenoconazol.

3.7 Análise estatística dos dados

Os dados do FET foram analisados estatisticamente considerando cada poço como sendo uma réplica independente. A porcentagem de embriões a qual foi observada resposta positiva de pelo menos um dos indicadores de letalidade após o período de 96h foi plotado com base na dose-resposta. Para calcular os valores de CL_{50} , CE_{50} e limites de confiança foi utilizado o programa estatístico Statistica 7.0 por meio da análise de modelo logístico. Os dados de misturas foram analisados no programa MIXTOX. Os dados de comportamento foram analisados pelo software Statistic 7.0 utilizando os métodos de Shapiro-Wilk e Levene para avaliação da normalidade e homogeneidade, e em caso de dados paramétricos utilizou-se a ANOVA *one-way* seguida do *pos-hoc* de Tukey. Em caso de dados não paramétricos realizou-se análise por Kruskal-Wallis. Diferenças significativas entre os grupos foram aceitas com $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Testes FET – compostos isolados

Após 96h de exposição dos embriões ao Kraft 36EC® foram observados atrasos na eclosão de todos os ovos expostos às cinco diferentes concentrações testadas, registrando-se ainda aumento na porcentagem de edemas de pericárdio nos organismos expostos as duas maiores concentrações. A EC_{20} , 96h calculada foi de $16,05 \text{ mg L}^{-1}$ ($15,38 - 16,71 \text{ mg L}^{-1}$). A mortalidade de 30% dos organismos expostos à maior concentração foi observada após 96h e, após 120h, verificou-se a mortalidade de 100% dos organismos na maior concentração. Com isso, a CL_{50} , 120h do inseticida Kraft 36EC® foi de $3,83 \text{ mg L}^{-1}$ de abamectina ($2,77 - 4,88 \text{ mg L}^{-1}$), com nível de confiança de 95%. Após 48h observou-se diminuição significativa nos batimentos cardíacos dos embriões expostos ao Kraft 36EC® nas maiores concentrações (Figura 6).

Após 96h de exposição dos embriões ao Score 250EC® registrou-se aumento na mortalidade e atraso na eclosão dos ovos nas maiores concentrações. A CL_{50} , 96h do fungicida Score 250EC® foi de $3,58 \text{ mg L}^{-1}$ de difenoconazol ($3,44 - 3,72 \text{ mg L}^{-1}$), com nível de confiança de 95%. A CE_{50} , 96h relacionada ao atraso na eclosão dos ovos expostos ao Score 250EC® foi de $2,21 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,11 - 2,31 \text{ mg L}^{-1}$) de difenoconazol. Foi observado também, após 120h, um aumento na porcentagem de edemas de pericárdio nos embriões expostos às concentrações maiores. A CE_{50} , 120h, relacionada à ocorrência de edemas de pericárdio em organismos expostos ao Score 250EC®, também foi de $2,21 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,11 - 2,31 \text{ mg L}^{-1}$) de difenoconazol. Após 48h verificou-se diminuição significativa nos batimentos cardíacos dos embriões expostos ao Score 250EC®, nas maiores concentrações (Figura 6).

Figura 2. 6 – Gráfico dos batimentos cardíacos dos embriões de *Danio rerio* expostos ao Kraft 36EC® (esquerda) e ao Score 250EC® (direita) após 48h de exposição contados durante 20 segundos. * Diferenças significativas em relação ao controle

Na Figura 7 são apresentados registros fotográficos obtidos ao final do experimento dos organismos expostos ao inseticida Kraft 36EC® e ao fungicida Score 250EC®. Na Figura 7A e 7E observa-se o controle 96h e 120h, respectivamente, com larvas de *Danio rerio* saudáveis e na Figura 7B o atraso na eclosão do ovo do organismo exposto ao inseticida após 96h. Edemas de pericárdio nos embriões também são observados nos organismos expostos ao Kraft 36EC® após 96 e 120h (Figura 7C e 7F) e por fim, a mortalidade dos organismos após 120h (Figura 7G). Na Figura 7D observa-se o atraso na eclosão dos ovos e edemas de pericárdio nos embriões expostos ao Score 250EC® por 96h, e na Figura 7H o organismo morto após 120h de exposição ao fungicida.

Figura 2. 7 - Fotos dos organismos do teste FET. A – Larva saudável de *Danio rerio* do controle 96h; B – Atraso na eclosão do ovo de *Danio rerio* exposto ao Kraft 36EC® após 96h de exposição; C – Edemas de pericárdio em embriões de *Danio rerio* expostos ao Kraft 36EC® após 96h de exposição; D – Atraso na eclosão do ovo e edemas em embrião de *Danio rerio* expostos ao Score 250EC® após 96h de exposição; E - Larva saudável de *Danio rerio* do controle 120h; F – Atraso na eclosão e edema em embrião de *Danio rerio* exposto ao Kraft 36EC® após 120h de exposição; G – Organismo morto após 120h de exposição ao Kraft 36EC®; H – Organismo morto após 120h de exposição ao Score 250EC®.

4.2 Testes misturas

Após 24, 48 e 72 horas de exposição dos embriões às misturas dos compostos, os valores das CE_{50} relacionados a sobrevivência não puderam ser obtidos, assim como seus valores de b . O mesmo aconteceu com os dados de atraso na eclosão dos ovos. Portanto, a análise das misturas não pode ser realizada. Porém, os dados obtidos no teste de sobrevivência às misturas após 96h de exposição, se ajustaram melhor no modelo de ação independente (IA). Com os efeitos das misturas de Kraft 36EC® e Score 250EC® sobre a sobrevivência dos ovos de *Danio rerio* (Tabela 1), o modelo IA produziu uma soma dos resíduos quadrados (SS) de 49,41 ($p = 1,41 \times 10^{-89}$), que explica 89% dos dados. Após adicionar o parâmetro “a” ao

modelo IA a fim de descrever sinergismo ou antagonismo (S/A), o valor de SS diminuiu levemente para 49,11 ($p=0,61$), sem nenhuma significância estatística (Tabela 1). Ao continuar com o teste para o desvio da proporção da dose (DR), quando os parâmetros “a” e “ b_{DR} ” foram adicionados, houve uma leve diminuição do valor de SS para 49,39 quando comparado com o valor obtido para o modelo IA, sem qualquer significância estatística ($p=0,99$) (Tabela 1). Quando os parâmetros “a” e “ b_{DL} ” foram adicionados na análise do desvio do nível da dose (DL), foi observado que o valor de SS foi significativamente diminuído para 39,13 ($p=0,006$), explicando 92% dos dados.

Tabela 2. 1 - Sumário da análise do teste de toxicidade realizado com o peixe *Danio rerio*, quando a sobrevivência dos ovos foi observada nas exposições das misturas de Kraft 36EC® e Score 250EC®

	IA	S/A	DR	DL
max	0.85	0.84	0.83	0.83
β Kraft 36EC®	28.31	28.31	28.86	30.78
β Score 250EC®	16.80	16.81	11.30	17.37
CE ₅₀ Kraft 36EC®	5.32	5.36	5.39	5.31
CE ₅₀ 250EC®	1.08	1.10	1.14	1.05
a	-	-1.07	0.68	25.79
$b_{DR/DL}$	-	-	-3.31	1.88
SS	49.41	49.15	49.39	39.13
R^2	0.89	0.90	0.89	0.92
χ^2 or test F	419.88	0.26	0.02	10.28
df	-	1	2	2
$p(\chi^2/F)$	1.41×10^{-89}	0.61	0.99	0.006

max é o valor de resposta máxima; β é o declive da curva de resposta do químico individual; CE₅₀ é a concentração letal média; a, b_{DR} e b_{DL} são parâmetros da função; SS é a soma dos resíduos quadrados; R^2 é o coeficiente de regressão; χ^2 ou Teste F é o teste estatístico; df é o grau de liberdade; e $p(\chi^2/F)$ é o nível de significância do teste estatístico. IA é o modelo da ação independente, S/A é o desvio de sinergismo ou antagonismo, DR é o desvio dependente da proporção da dose e DL é o desvio dependente do nível da dose.

Portanto, para a sobrevivência dos ovos de *Danio rerio*, o desvio DL a partir do modelo IA provou ser o melhor ajuste aos dados, como pode ser visto no padrão de dose-resposta na Figura 8. Os valores positivos de “a” e “b” ($b = 1,88$) indicaram antagonismo em baixo nível da dose, com a mudança para o sinergismo em um nível da dose maior do que CE₅₀ (Tabela 1 e Figura 8).

Figura 2. 8 - Isoblograma dos efeitos das misturas dos pesticidas Kraft 36EC® e Score 250EC sobre a sobrevivência dos ovos do peixe *Danio rerio*. As linhas côncavas nas menores concentrações representam um efeito antagônico e as linhas convexas acima da CE_{50} representam efeito sinérgico

4.3 Testes comportamento

Na Figura 9 pode ser observado que os organismos expostos às duas maiores concentrações de Kraft 36EC® (gráfico da esquerda) tiveram menor capacidade de natação, identificado pela menor distância percorrida durante os 20 minutos de análise. Verificou-se também uma resposta comum no comportamento das larvas pela variação das condições de claro e escuro, uma vez que ocorreu maior atividade de natação quando os organismos foram submetidos ao período escuro a partir do sexto minuto de leitura até o décimo, e nos últimos cinco minutos finais da análise. O mesmo comportamento de claro e escuro foi observado na exposição às concentrações subletais do Score 250EC® (Figura 9). Durante os 10 minutos finais de leitura houve uma diminuição significativa na capacidade de natação das larvas expostas a todas as concentrações subletais do Score 250EC® testadas. Verificou-se, ainda, que nos períodos de escuro a menor concentração subletal utilizada foi a que mais influenciou na capacidade de natação das larvas.

Figura 2. 9 - Gráfico da distância total percorrida pelas larvas de *Danio rerio* expostas às diferentes concentrações subletais do Kraft 36EC® e do Score 250EC®. Em ambos, variou-se as condições de claro (minuto 1 ao minuto 5 e minuto 11 ao 15) e de escuro (de 6 a 10 e 16 a 20 minutos)

5. Discussão

Sabe-se que a abamectina é um inseticida fortemente neurotóxico, pois ativa o principal neurotransmissor inibidor do sistema nervoso central, o ácido gama aminobutírico (GABA). Muitos estudos utilizando diferentes organismos teste mostram os efeitos tóxicos gerados pela exposição ao composto e suas diferentes formulações comerciais (MOREIRA et al., 2017; NOVELLI et al., 2012, 2016; PADILLA et al., 2012; SANCHES et al., 2017; TIŠLER; KOŽUH ERŽEN, 2006; VASCONCELOS et al., 2016).

O Kraft 36EC®, agrotóxico amplamente utilizado principalmente nas culturas de morango, foi a formulação comercial do inseticida abamectina utilizada neste estudo. A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa e em trabalhos anteriores verificou-se que a fase adulta é o estágio de vida mais sensível do *Danio rerio* em exposições agudas ao Kraft 36EC®, seguida da embrionária. A CL_{50} calculada nos testes realizados com embriões (CL_{50} , embriões = $3,83 \text{ mg L}^{-1}$ com intervalo de confiança de $2,77 - 4,88 \text{ mg L}^{-1}$) é aproximadamente 65 vezes maior que a obtida na exposição aos organismos adultos (CL_{50} , adultos = $0,059 \text{ mg L}^{-1}$ com intervalo de confiança de $0,054 - 0,063 \text{ mg L}^{-1}$).

De fato, a partir de dados de mortalidade encontrados em diferentes estudos realizados com adultos e embriões de *Danio rerio* (Tabela 2), pode-se concluir que o estágio de vida mais sensível do *zebrafish* é a fase adulta (DOMINGUES et al., 2016; NOVELLI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016; SANCHES et al., 2017; TIŠLER; KOŽUH ERŽEN, 2006; WEIL et al., 2009).

Tabela 2. 2 - Valores selecionados de toxicidade em curto prazo de abamectina e ivermectina para adultos de zebrafish, juvenis e embriões

Composto	Estagio de vida	Parâmetro	Tempo (d)	Endpoint	Concentração (mg L ⁻¹)	Referências
Abamectina	Adultos	Mortalidade	4	CL50	0,059	(SANCHES et al., 2017)
Abamectina	Adultos	Mortalidade	4	CL50	0,055	(TIŠLER; KOŽUH ERŽEN, 2006)
Abamectina	Adultos	Mortalidade	2	CL50	0,033	(NOVELLI et al., 2012)
Ivermectina	Adultos	Mortalidade	4	CL50	0,075	(OLIVEIRA et al., 2016)
Ivermectina	Adultos	Mortalidade	4	CL50	0,073	(DOMINGUES et al., 2016)
Abamectina	Embriões	Mortalidade	4	CL50	3,83	Presente estudo
Ivermectina	Embriões	Mortalidade	5	CL50	1,04	(OLIVEIRA et al., 2016)
Ivermectina	Embriões	Mortalidade	2	CL50	> 4,0	(WEIL et al., 2009)
Ivermectina	Juvenis	Mortalidade	4	CL50	0,017	(OLIVEIRA et al., 2016)
Ivermectina	Adultos	Comportamento (mobilidade, postura)	3	CE50	0,23	(OLIVEIRA et al., 2016)
Ivermectina	Adultos	Comportamento (mobilidade, postura)	3	CE10	0,023	(OLIVEIRA et al., 2016)
Abamectina	Adultos	Comportamento (mobilidade)	4	CE50	0,049	(TIŠLER; KOŽUH ERŽEN, 2006)
Abamectina	Adultos	Comportamento (mobilidade)	4	CE10	0,021	(TIŠLER; KOŽUH ERŽEN, 2006)
Ivermectina	Embriões	Comportamento (mobilidade)	2	CE50	0,17	(WEIL et al., 2009)
Ivermectina	Embriões	Comportamento (mobilidade)	2	CE10	0,17	(WEIL et al., 2009)
Ivermectina	Embriões	Comportamento (mobilidade)	6	CE50	0,44	(CARLSSON et al., 2013)
Ivermectina	Embriões	Comportamento (mobilidade)	6	NOEC	0,46	(CARLSSON et al., 2013)
Ivermectina	Embriões	Comportamento (mobilidade)	3	CE50	0,093	(OLIVEIRA et al., 2016)
Ivermectina	Embriões	Comportamento (mobilidade)	3	CE10	0,036	(OLIVEIRA et al., 2016)
Abamectina	Juvenis	Comportamento (mobilidade)	4	NOEC	0,0083	Presente estudo
Ivermectina	Juvenis	Comportamento (mobilidade, postura)	3	CE50	0,02	(OLIVEIRA et al., 2016)
Ivermectina	Juvenis	Comportamento (mobilidade, postura)	3	CE10	0,016	(OLIVEIRA et al., 2016)
Abamectina	Embriões	Formação de edemas	4	CE50	> 11,7	Presente estudo
Abamectina	Embriões	Atraso na eclosão	4	CE50	< 0,5	Presente estudo
Abamectina	Embriões	Viabilidade, atraso, má formação	5	CE50	0,015	(PADILLA et al., 2012)
Ivermectina	Embriões/ Juvenis	Desenvolvimento	4	CE50	0,38	(OLIVEIRA et al., 2016)
Ivermectina	Embriões	Atraso na eclosão	4	CE50	0,48	(OLIVEIRA et al., 2016)

Porém, quando são observados os dados relacionados ao comportamento (mobilidade), percebe-se que não há o mesmo padrão de resposta entre os diferentes estudos realizados (Tabela 2). Em Oliveira et al. (2016), por exemplo, a partir de experimentos utilizando a ivermectina, composto do mesmo grupo químico que a abamectina, foi observado maior sensibilidade dos embriões quando comparado com os experimentos com adultos em testes de comportamento (mobilidade). Além disso, assim como no presente estudo, os autores verificaram que a exposição dos embriões de *zebrafish* à ivermectina provoca a ausência de

contrações espontâneas da cauda do embrião, o que influencia negativamente no desenvolvimento, eclosão do ovo e locomoção do organismo (OLIVEIRA et al., 2016).

Nos testes de comportamento realizados com concentrações subletais, verificou-se que o Kraft 36EC® parece influenciar na capacidade de natação dos organismos após 120h de vida e exposição. Este efeito foi avaliado pela diferença entre as distâncias percorridas pelos organismos controle e os expostos ao inseticida nas concentrações de 18,1 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$. Este comportamento pode ser explicado devido aos efeitos já observados em diferentes estudos, em que a abamectina/ivermectina provoca a ausência de contrações espontâneas da cauda do embrião, o que influencia negativamente no desenvolvimento e locomoção do organismo (OLIVEIRA et al., 2016; PADILLA et al., 2012).

O difenoconazol pertence ao grupo químico dos triazoles e é um eficiente fungicida, pois é responsável pela inibição da biossíntese do esterol, principal componente da membrana celular dos fungos (MOREIRA et al., 2017). No Brasil, este praguicida é muito utilizado principalmente nas culturas de morango e batata, e alguns estudos mostram os efeitos tóxicos causados por esse composto e suas formulações comerciais a diferentes organismos (DONG et al., 2013; MOREIRA et al., 2017; MU et al., 2015, 2016; PADILLA et al., 2012; SANCHES et al., 2017).

O Score 250EC® foi a formulação comercial do difenoconazol utilizada neste estudo e os dados obtidos mostram que a CL_{50} para embriões de *Danio rerio* (CL_{50} , embriões = 3,58 mg L^{-1} com intervalo de confiança de 3,44 – 3,72 mg L^{-1}) é 2,5 vezes maior que a CL_{50} obtida nos testes utilizando organismos adultos (CL_{50} , adultos = 1,41 mg L^{-1} com intervalo de confiança de 1,40 – 1,43 mg L^{-1}).

Resultados de CL_{50} , 96h semelhantes foram encontrados por Mu et al. (2013) e Dong et al. (2013) e podem ser observados na Tabela 3. Mu et al. (2013) consideraram a fase larval (juvenis) como sendo a mais sensível do *Danio rerio* após exposição ao fungicida difenoconazol, seguida da adulta e embrionária. Em um estudo complementar, Mu et al. (2015) identificaram que a principal causa desta diferença de sensibilidade entre embriões e adultos possivelmente deve-se à maior resistência dos embriões aos danos oxidativos induzidos pela exposição ao difenoconazol. Além disso, destacou-se que a diferença de sensibilidade não se deve à bioacumulação, pois a concentração de difenoconazol quantificada nos tecidos em adultos e embriões foi similar. Sendo assim, para este composto, descartou-se a possibilidade do cório agir como barreira na acumulação do composto.

Tabela 2. 3 - Valores selecionados de toxicidade a curto prazo do difenoconazol para adultos de zebrafish, juvenis e embriões

Composto	Estágio de vida	Parâmetro	Tempo (d)	Endpoint	Concentração (mg L ⁻¹)	Referências
Difenoconazol	Adultos	Mortalidade	4	CL50	1,41	(SANCHES et al., 2017)
Difenoconazol	Adultos	Mortalidade	4	CL50	1,45	(MU et al., 2013)
Difenoconazol	Adultos	Mortalidade	4	CL50	1,33	(DONG et al., 2013)
Difenoconazol	Embriões	Mortalidade	4	CL50	3,58	Presente estudo
Difenoconazol	Embriões	Mortalidade	4	CL50	2,34	(MU et al., 2013)
Difenoconazol	Juvenis	Mortalidade	4	CL50	1,17	(MU et al., 2013)
Difenoconazol	Juvenis	Comportamento (mobilidade)	4	NOEC	< 0,047	Presente estudo
Difenoconazol	Juvenis	Diminuição dos batimentos cardíacos e tamanho do corpo; pigmentação; deformação na cauda	4	NOEC	< 0,5	(MU et al., 2013, 2016)
Difenoconazol	Embriões	Diminuição dos batimentos cardíacos	4	NOEC	0,5	(MU et al., 2013)
Difenoconazol	Embriões	Atraso na eclosão dos ovos	4	CE50	2,21	Presente estudo
Difenoconazol	Embriões	Formação de edemas	4	CE50	2,21	Presente estudo
Difenoconazol	Embriões	Viabilidade, atraso e más formações	5	CE50	1,44	(PADILLA et al., 2012)

Além da letalidade, neste estudo utilizando a formulação comercial do difenoconazol (Score 250EC®) foi observado um aumento na porcentagem dos casos de organismos com edemas e atrasos na eclosão dos ovos expostos às maiores concentrações. Estes efeitos podem ter influenciado na capacidade de natação dos organismos, uma vez que houve diferenças nas distâncias percorridas entre organismos controles e aos expostos ao fungicida em baixas concentrações (47 µg L⁻¹). Outros estudos mostram também que, em exposições agudas (96h), embriões de *Danio rerio* expostos ao difenoconazol apresentaram efeitos como a diminuição de frequência cardíaca, inibição de crescimento e efeitos teratogênicos (MU et al., 2013, 2016; PADILLA et al., 2012).

Uma vez que os praguicidas Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e Score 250EC® (i.a. difenoconazol) são amplamente e simultaneamente utilizados nos diferentes cultivos do Brasil, estudos com as misturas binárias destes compostos foram realizados com embriões e adultos de *Danio rerio* a fim de investigar o efeito produzido nesses organismos. Quando os compostos possuem diferentes modos de ação, como é o caso do Kraft 36EC® e do Score 250EC®, o modelo matemático utilizado para calcular o efeito produzido nos organismos pela exposição às misturas é o modelo de ação independente (IA).

Em estudos realizados previamente pelo grupo, observou-se um efeito sinérgico produzido pela exposição aguda de adultos de *Danio rerio* às misturas de Kraft 36EC® (concentrações de 20 a 100 µg L⁻¹ de abamectina) e Score 250EC® (0,5 a 2,5 mg L⁻¹ de difenoconazol) (SANCHES et al., 2017). Já nos testes utilizando embriões de *Danio rerio*

expostos às misturas destes dois compostos (concentrações de 0,5 a 11,7 mg L⁻¹ de abamectina nas soluções de Kraft 36EC® e de 0,2 a 5 mg L⁻¹ de difenoconazol nas soluções de Score 250EC®) observou-se efeito antagônico nas menores concentrações e efeito sinérgico nas maiores. Moreira et al. (2017) observaram efeito semelhante de antagonismo nas menores concentrações e sinergismo nas maiores em cladóceros expostos às misturas binárias do Kraft 36EC® e Score 250EC®. Porém, pouco se sabe sobre a toxicocinética e toxicodinâmica desses compostos em misturas e as causas desses efeitos em organismos aquáticos.

Neste estudo foram realizados diferentes testes com embriões e adultos de *Danio rerio* expostos ao Kraft 36EC® e ao Score 250EC®, isolados e em misturas, e pode-se perceber que estes compostos são tóxicos e geram sérios efeitos deletérios nas diferentes fases de vida de peixes. Portanto, muita atenção e cautela devem ser direcionadas ao uso desses compostos nos campos agrícolas, evitando danos irreversíveis nos ecossistemas aquáticos locais.

6. Conclusão

Em exposições agudas, adultos de *Danio rerio* foram mais sensíveis ao inseticida Kraft 250EC® (i.a. abamectina) que os embriões. Além disso, na fase embrionária, a exposição do *Danio rerio* a este agrotóxico ocasiona formação de edemas, atrasos na eclosão dos ovos e comprometimento da capacidade de natação das larvas. A sensibilidade de adultos de *Danio rerio* também é maior quando comparado a embriões expostos ao Score 250EC® (i.a. difenoconazol) em exposições agudas, registrando-se formação de edemas e atrasos na eclosão dos ovos. Efeito sinérgico foi verificado quando adultos de *Danio rerio* foram expostos às misturas de Kraft 250EC® e Score 250EC®, ocorrendo efeitos antagônicos e sinérgicos em embriões quando expostos às menores e maiores concentrações, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- BELANGER, S. E.; RAWLINGS, J. M.; CARR, G. J. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1768–1783, 2013.
- BRAUNBECK, T. et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 21, p. 16247–16261, 2015.
- CARLSSON, G. et al. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*)

embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 30–41, 2013.

CHEMINOVA. **KRAFT 36EC®**. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/kraft.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

DOMINGUES, I. et al. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 338–345, 2010.

DOMINGUES, I. et al. Effects of ivermectin on *Danio rerio*: a multiple endpoint approach: behaviour, weight and subcellular markers. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 491–499, 2016.

DONG, F. et al. Chiral triazole fungicide difenoconazole: Absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 7, p. 3386–3394, 2013.

JONKER, M. J. et al. Significance Testing of Synergistic / Antagonistic , Dose Level – Dependent , or Dose Ratio – Dependent Effects in Mixture Dose – Response Analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2701–2713, 2005.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.

LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196–209, 2009.

MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58–66, 2017.

MU, X. et al. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 147–157, 2013.

MU, X. et al. Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio rerio*) during different life stages. **Aquatic Toxicology**, v. 160, p. 57–68, 2015.

MU, X. et al. The developmental effect of difenoconazole on zebra fish embryos: A mechanism research. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 18–26, 2016.

NOVELLI, A. et al. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 36–40, 2012.

NOVELLI, A. et al. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec®18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1408–1414, 2016.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 1063–1071, 2012.

OECD. Oecd guidelines for the testing of chemicals - **Fish Embryo Acute Toxicity (FET)**

Test, v. 34, n. March, p. 1–18, 2013.

OLIVEIRA, R. et al. Multilevel assessment of ivermectin effects using different zebra fish life stages. **Comparative Biochemistry and Physiology , Part C**, v. 187, p. 50–61, 2016.

OLIVEIRA, V. B. M.; BIANCHI, M. O.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Hazard assessment of the pesticides KRAFT 36 EC and SCORE in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9999, n. 9999, p. 1–6, 2018.

PADILLA, S. et al. Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 174–187, 2012.

SANCHES, A. L. M. et al. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, p. 582–587, 2017.

SCHEIL, V. et al. Effects of 3,4-dichloroaniline and diazinon on different biological organisation levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 3, p. 355–363, 2009.

SYNGENTA. **SCORE**®. Disponível em: <https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/score_1.pdf?token=1511171921>. Acesso em: 19 fev. 2018.

TIŠLER, T.; KOŽUH ERŽEN, N. Abamectin in the aquatic environment. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 6, p. 495–502, 2006.

VASCONCELOS, A. M. et al. Acute and chronic sensitivity, avoidance behavior and sensitive life stages of bullfrog tadpoles exposed to the biopesticide abamectin. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 500–509, 2016.

WEIL, M. et al. Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 28, n. 9, p. 1970–8, 2009.

Capítulo 3

Análise de biomarcadores em brânquias de *Danio rerio* expostos a abamectina, ao difenoconazol e suas formulações comerciais (Kraft 36EC® e Score 250EC®), em exposições isoladas e misturas

Ana Letícia Madeira Sanches ^a, Michiel A. Daam^{a, b}, Fabrício Barreto Teresa ^c, Bruna Horvath Vieira ^a, Marina Vanderlei Reghini ^a, Eduardo Alves de Almeida ^d, Evaldo L.G. Espíndola ^a

^a NEEA/CRHEA/SHS, Escola de Engenharia de São Carlos, Av. Trabalhador São Carlense, 400, 13.560-970 São Carlos, Brasil

^b CENSE, Departamento de Engenharia e Ciências Ambientais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal

^c UEG – Universidade do Estado de Goiás, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UnUCET), Anápolis, Goiás, Brasil

^d Departamento Química e Ciências Ambientais, IBILCE/UNESP - Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15.054.000 São José do Rio Preto, SP, Brasil

RESUMO

Agrotóxicos são lançados no ambiente diariamente e os efeitos em espécies não alvos de ecossistemas aquáticos têm sido amplamente relatados. A fim de avaliar os efeitos adversos causados em adultos de *Danio rerio* expostos aos agrotóxicos abamectina, difenoconazol e suas formulações comerciais (Kraft 36EC® e Score 250EC®), isoladas e em misturas, foram analisados biomarcadores bioquímicos nas brânquias de organismos expostos a concentrações subletais em diferentes tratamentos. Analisou-se as atividades das enzimas 7-etóxi-resorufina-0-deetilase (EROD), glucuronosiltransferase (UDPGT), glutatona-S-transferase (GST), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), níveis de hidroperóxidos lipídicos (HL) e de malondialdeído (MDA), indicativos de estresse oxidativo. Pelos resultados obtidos verificou-se um aumento significativo na atividade da enzima de biotransformação EROD e nos níveis de MDA nas brânquias de peixes expostos à formulação comercial da abamectina. Quando expostos ao difenoconazol e sua formulação comercial, observou-se um aumento na atividade da GST, GPx e níveis de MDA, e diminuição da GR nas brânquias dos peixes. Verificou-se, ainda, um aumento nas respostas dos biomarcadores analisados nas brânquias dos organismos expostos às misturas tanto dos princípios ativos quanto das formulações comerciais de ambos os agrotóxicos. Conclui-se que as formulações comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC® e às misturas das mesmas promovem alterações significativas no metabolismo de detoxificação dos organismos expostos e causam estresse oxidativo em peixes.

Palavras-chave: *Danio rerio*, biotransformação, defesa antioxidante, estresse oxidativo.

1. Introdução

Análises de biomarcadores possibilitam o reconhecimento dos efeitos subletais de diferentes xenobióticos em organismos aquáticos logo nos primeiros dias da exposição. Desta forma, danos irreversíveis, como a letalidade, podem ser evitados precocemente por meio destas análises, se forem identificados efeitos deletérios em níveis metabólicos (ALMEIDA; RIBEIRO, 2014; KROON; STRETEN; HARRIES, 2017).

Em uma situação de contaminação, o metabolismo de detoxificação dos organismos age de forma a eliminar compostos tóxicos, excretando-os. Para isso, ocorrem diversas reações catalisadas por enzimas que transformam esses contaminantes em compostos solúveis para serem mais facilmente excretados. A atividade de enzimas de biotransformação, de defesa antioxidante e parâmetros de estresse oxidativo são exemplos de biomarcadores utilizados em análises ecotoxicológicas (ALMEIDA; RIBEIRO, 2014; KROON; STRETEN; HARRIES, 2017; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O metabolismo de biotransformação de compostos químicos pode ser dividido em três fases: na fase I ocorrem as reações de oxidação, redução ou hidrólise; na fase II acontecem as reações de conjugação; e na fase III ocorre a excreção (ALMEIDA; RIBEIRO, 2014). Dentre as enzimas de fase I, podem ser incluídos os citocromos P450, que são heme-proteínas ligadas à membrana e localizam-se principalmente nas células hepáticas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) é o nome dado a isoforma 1A do citocromo P450 (CYP1A) quando age sobre o substrato 7-etóxi-resorufina. A EROD é muito avaliada em estudos de contaminação aquática e é considerada um bom biomarcador em peixes (WHYTE et al., 2000).

Dentre as de fase II estão as glucuronosiltransferase (UDPGT) e glutathione S-transferases (GST), que são enzimas catalisadoras da reação de conjugação de glutathione reduzida (GSH), com uma variedade de substratos de caráter eletrofílicos. O substrato artificial utilizado na avaliação da atividade da GST total é o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Este substrato é muito utilizado em função da ampla faixa de detecção das diferentes isoformas da GST (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Apesar de serem menos utilizadas como biomarcador, as UDPGT é uma importante classe de enzimas, pois catalisam a reação do ácido glucurônico a substratos na detoxificação e excreção de substâncias tóxicas (KROON; STRETEN; HARRIES, 2017; MEECH; MACKENZIE, 1997).

Essa atividade de biotransformação, aliada ao aumento do consumo de oxigênio para produção de energia na mitocôndria e ao aumento de reações redox promovidas por diversos

tipos de compostos tóxicos nas células, gera espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas ERO são, na maioria das vezes, radicais livres que podem reagir rapidamente com as biomoléculas, causando sua desestruturação, muitas vezes com decorrente perda de sua função. Os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxil ($OH^{\cdot}$), e outras moléculas pró-oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são exemplos de ERO (COSTANTINI, 2010).

As ERO geradas no metabolismo de biotransformação são balanceadas pelas defesas antioxidantes como as Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR). A SOD age convertendo os radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio, enquanto que as catalases e peroxidases convertem o peróxido de hidrogênio gerado em água. A GR, por sua vez, transforma a glutathione oxidada produzida pela peroxidase em glutathione reduzida utilizando elétrons do NADPH (Figura 1). Com isso, essas enzimas formam um sistema de defesa antioxidante que combate a formação das ERO, pois convertem os radicais reativos em moléculas não reativas e protegem as células dos danos oxidativos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Figura 3. 1 – Ilustração sobre a atuação das enzimas de defesa antioxidantes convertendo os radicais reativos em moléculas não reativas

Fonte: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/920398/fig2/>. Acesso em 09/05/2018

Porém, um desbalanço entre a produção de ERO e a atuação de enzimas antioxidantes podem causar danos ao DNA, às proteínas e aos lipídeos, podendo afetar diretamente a permeabilidade das membranas celulares pelo processo de peroxidação lipídica. Existem alguns parâmetros indicadores de estresse oxidativo e entre eles estão os hidroperóxidos lipídicos e níveis de malondialdeído (MDA). Os hidroperóxidos lipídicos são produtos primários e o MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica. Esses compostos

podem ser quantificados e usados como indicativo de estresse oxidativo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Na Figura 2 está apresentado, resumidamente, o que acontece no metabolismo do peixe após a absorção do composto químico presente na água. A principal via de contato do peixe com contaminantes presentes na água são as brânquias e, a partir da absorção por este órgão filtrador, compostos tóxicos lipofílicos acumulam-se nos tecidos e fluidos do peixe. O metabolismo de biotransformação é ativado de forma que, durante a Fase I desse metabolismo, ocorra um aumento na atividade da enzima de biotransformação EROD, a fim de tornar os compostos tóxicos lipofílicos absorvidos em compostos mais solúveis para serem excretados na fase 3. Com a mesma função, as enzimas de fase II, UDPGT e GST, irão conjugar os produtos gerados na fase I com compostos polares facilitando a excreção.

Figura 3. 2 – Ilustração das diferentes fases do metabolismo de biotransformação de compostos tóxicos e as enzimas e parâmetros que podem ser quantificados em cada processo. Adaptado de <https://smart.servier.com>

Porém, durante o metabolismo de biotransformação, e com a produção de energia na mitocôndria, as ERO são geradas. Com a ativação do metabolismo de defesa antioxidante, as ERO são transformadas em moléculas não reativas protegendo as células do estresse oxidativo. Porém, se ocorrer um desbalanço entre a produção de ERO e a atuação das defesas antioxidantes, o estresse oxidativo pode ser observado por meio de indicadores como o aumento de hidroperóxidos lipídicos e de níveis de MDA. Com isso, a análise de biomarcadores para avaliação de toxicidade de agrotóxicos tem sido usada extensivamente para fornecer a conexão entre os níveis externos de exposição a contaminantes, níveis internos

de contaminação dos tecidos e os efeitos adversos precoces gerados nos organismos (KROON; STRETEN; HARRIES, 2017).

O uso de biomarcadores em estudos anteriores utilizando metais, corantes, derivados de petróleo, agrotóxicos, etc., mostram as contribuições e a importância da análise dos efeitos metabólicos desses compostos em diferentes organismos testes (CHAMBERS et al., 2002; DOMINGUES et al., 2010; FRASCO; GUILHERMINO, 2002; GHISI et al., 2017; GRAVATO et al., 2014; KROON; STRETEN; HARRIES, 2017; STEFANI MARGARIDO et al., 2013; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003).

Os biomarcadores são, portanto, importantes ferramentas indicadoras de contaminação, pois a partir destas análises torna-se possível entender a toxicocinética dos diferentes tipos de contaminantes. Por atuar como um sistema de alerta precoce, a análise dos biomarcadores evita que danos irreversíveis como a letalidade de diferentes espécies ocorra. Diante do exposto, estudos envolvendo esta abordagem são altamente recomendados.

2. Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos subletais do Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e do Score 250EC® (i.a. difenoconazol), isolados e em misturas, no metabolismo de adultos de *Danio rerio*. Para isto realizou-se exposições agudas com os organismos expostos aos diferentes tratamentos em laboratório e avaliaram-se nas brânquias dos peixes enzimas de biotransformação, enzimas de defesa antioxidante e parâmetros de estresse oxidativo.

Os objetivos específicos foram:

- Analisar em brânquias de *Danio rerio* as atividades das enzimas de biotransformação EROD, UDPGT e GST; de defesa antioxidante CAT, GPx e GR; níveis de hidroperóxidos e MDA após 48h de exposição aos i.a. abamectina e difenoconazol, suas respectivas formulações comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC® e misturas;
- Avaliar as respostas enzimáticas e identificar a ocorrência de estresse oxidativo, além de calcular o IBR (*Integrated biomarker response*) a fim de avaliar os efeitos e a influência dos diferentes biomarcadores analisados.

3. Material e métodos

3.1 Organismos teste e aclimação

Peixes adultos da espécie *Danio rerio* foram utilizados como organismo-teste nos ensaios ecotoxicológicos para a avaliação dos biomarcadores nas exposições em laboratório. Os peixes foram aclimatados segundo recomendações da NBR 15088 (ABNT, 2016). Todas as informações sobre a obtenção dos organismos testes, aclimação, biometria e testes de sensibilidade com o sal de referência cloreto de potássio (KCl) são as mesmas descritas no Capítulo 1 e no APÊNDICE C – Aclimação, biometria e testes de sensibilidade com adultos de *Danio rerio*.

3.2 Exposições em laboratório para análise de biomarcadores

Os padrões analíticos dos princípios ativos de cada composto abamectina PESTANAL® (31732 Sigma-Aldrich - CAS: 71751-41-2) e difenoconazol PESTANAL® (36531 Sigma-Aldrich - CAS: 119446-68-3), foram adquiridos na Sigma-Aldrich, padrão analítico. Os padrões foram diluídos em acetona e, a partir das soluções estoques de 1 mg mL⁻¹ de abamectina e 10 mg mL⁻¹ de difenoconazol, foram realizadas as diluições para as concentrações desejadas. Os produtos comerciais Kraft 36EC® (CHEMINOVA, 2014) e Score 250EC® (SYNGENTA, 2017) foram obtidos comercialmente em uma loja de insumos agrícolas. As caldas do inseticida Kraft 36EC® e do fungicida Score 250EC® foram preparadas em água destilada de acordo com as concentrações recomendadas pelos fabricantes para os cultivos de morango - 10,8 mg L⁻¹ de abamectina na calda do Kraft 36EC® e 100 mg L⁻¹ de difenoconazol na calda do Score 250EC®. A partir das caldas foram feitas as diluições para se obter as concentrações desejadas.

Peixes da espécie *Danio rerio* foram expostos em laboratório por 48h às concentrações de efeito não observado (CENO) de cada composto, calculadas a partir dos resultados dos testes de toxicidade obtidos nos experimentos do Capítulo 1. Foram realizados oito tratamentos: controle, controle solvente (acetona), abamectina, Kraft 36EC®, difenoconazol, Score 250EC®, misturas de abamectina + difenoconazol, e misturas de Kraft 36EC® + Score 250EC®. Os valores de CL₅₀, 48h obtidos nos testes de toxicidade, bem como os valores de CENO, 48h utilizados para os diferentes grupos experimentais, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 3. 1 - Concentrações subletais (CENO, 48h) utilizadas nos experimentos de exposição para análise de biomarcadores nas brânquias de peixes *Danio rerio*. Os valores foram calculados a partir de resultados de testes de toxicidade descritos no Capítulo 1

Tratamentos	CL ₅₀	CENO
Abamectina	58,6 µg/L (53,9 – 63,3)	20 µg/L
Kraft 36EC®	49,3 µg/L (46,6 – 52,1)	5,4 µg/L
Difenoconazol	1,41 mg/L (1,40 – 1,43)	1,0 mg/L
Score 250EC®	1,66 mg/L (1,64 – 1,68)	0,4 mg/L
Abamectina + Difenoconazol	30 µg/L aba + 1,05 mg/L difeno	20 µg/L + 0,2 mg/L
Kraft 36EC® + Score 250EC®	7,57 µg/L Kraft + 1,74 mg/L Score	5,4 µg/L + 0,8 mg/L

As exposições foram realizadas em cinco réplicas por grupo (n=5), em recipientes plásticos de 1L contendo três organismos cada (pools), em temperatura constante (25°C ± 2°C), fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), respeitando a proporção de 1g de peixe para 1L de solução e utilizando como meio a água de diluição, conforme recomendações da NBR 15088 (ABNT, 2016) (Figura 3).

Figura 3. 3 – Fotos dos experimentos de laboratório para análise de biomarcadores em brânquias de *Danio rerio* expostos aos diferentes tratamentos

Após 48h, os organismos foram coletados e anestesiados por imersão em 2 mL L⁻¹ de fenoxietanol em água. Observada a imobilidade/mortalidade dos peixes, os mesmos foram decapitados, tiveram suas brânquias retiradas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenadas em freezer a -80°C até o dia das análises.

3.3 Biomarcadores

Todas as análises de biomarcadores foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LBCA), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP (IBILCE), Campus de São José do Rio Preto, sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida. Foram analisadas as atividades das enzimas de biotransformação, das defesas antioxidantes, além de parâmetros de estresse oxidativo em brânquias de *Danio rerio* expostos aos diferentes tratamentos anteriormente descritos. As brânquias foram transportadas de São Carlos a São José do Rio Preto em nitrogênio líquido e foram imediatamente armazenadas no freezer do LBCA, a -80°C.

Os tecidos foram homogeneizados em tampão Tris 50 mM, pH 7,4, a uma proporção 1:4 vol:vol, contendo inibidores de protease PMSF. Posteriormente centrifugou-se a 10.000 x g por 20 minutos. A porção sobrenadante coletada foi novamente centrifugada a 50.000 x g por uma hora, obtendo assim a fração citosólica e microssomal. Na fração microssomal foram medidas as atividades da EROD e UDPGT e as demais atividades enzimáticas foram medidas na fração citosólica.

3.3.1 Análise das enzimas de biotransformação

A atividade da 7-etóxi-resorufina-O-deetilase (EROD) foi medida em leitor de microplacas por método fluorimétrico na fração microssomal dos extratos proteicos. O método consiste na formação de resorufina, que é fluorescente (excitação = 537 nm, emissão = 583 nm), catalisada pela EROD. Foram adicionados aos poços das microplacas tampão fosfato de potássio 80 mM pH 7,4, além de solução de 7-etoxiresorufina 335 µM, NADPH 10 mM e extrato microssomal. A reação foi observada por 5 min, a 30°C.

A atividade da glucuronosiltransferase (UDPGT) foi medida pelo método de Clarke, Georget e Burchell (1992) com modificações. Esse método baseia-se na reação de conjugação do grupo hidróxido do substrato p-nitrofenol com o ácido α -D-glucuronoíco formando o β -D-glucuronosil, catalisada pela UDPGT. Foram adicionados UDPGA 15,5 mM, tampão Tris-HCl 50 mM; MgCl 10 mM pH 7,4, microssoma, TCA 0,2 M e PNP 7 mM. Essa solução foi submetida a 30°C em banho maria durante 30 min. Posteriormente, foi adicionado TCA 0,2 M e centrifugou-se por 15 min a 3600 x g. No sobrenadante coletado, adicionou-se KOH 10 N. Centrifugou-se novamente por 15 min a 3600 x g obtendo por fim o sobrenadante para a leitura. A diminuição da absorbância foi observada em espectrofotômetro a 405 nm.

A atividade da GST foi avaliada pelo método de Keen, Habig e Jakoby (1976) adaptado a leitor de microplacas. A amostra foi adicionada a um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 100 mM e GSH 100 mM. O aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm à temperatura ambiente.

3.3.2 Análise das enzimas de defesa antioxidante

A atividade da CAT foi medida pelo método de Beutler (1975), quantificando-se a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima através do decréscimo de absorbância em 240 nm a 30°C. Foram adicionados às cubetas de quartzo H₂O₂ 10 mM, Tris 1 M e EDTA 5 mM, pH 8,0 e amostra na fração citosólica.

Realizou-se a análise da GPx pela técnica de Sies et al. (1979), adaptado ao leitor de microplacas, a qual se baseia na medida do decréscimo de absorbância a 340 nm, promovido durante a redução da glutatona oxidada (GSSG). A redução é catalisada pela glutatona redutase (GR) em presença de NADPH a 30°C. Adicionou-se aos poços das microplacas amostra na fração citosólica, tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5 mM pH 7,0, NADPH 0,2 mM, GR 0,1 U/ml e tBOOH 1 mM. A análise da GR foi realizada também a 340 nm, adicionando-se aos poços das microplacas amostra na fração citosólica, tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5 mM pH 7,0, GSSG 2mM, GSH 0,15 mM e NADPH 0,1 mM.

3.3.3 Análise da peroxidação lipídica

Os hidroperóxidos lipídicos (HL) foram analisados pelo método de xilenol-orange (FOX). Este método baseia-se no princípio de que os hidroperóxidos oxidam ferro II a ferro III, o qual reage com o xilenol-orange, produzindo um cromóforo que tem absorção máxima em 560 nm (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991).

Detectou-se também a presença do produto formado entre o MDA (produto da lipoperoxidação) e o ácido 2-tiobarbitúrico, via HPLC-UV (NOGUEIRA et al., 2011). No HPLC, as amostras de MDA-TBA foram injetadas diretamente (20 µL) e monitoradas a 532 nm a 40°C. A fase móvel foi composta de solução fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0 com 40% metanol, bombeada isocraticamente (1 mL/min). Utilizou-se uma coluna LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de poro). Os níveis de MDA foram quantificados com base em uma curva padrão injetando-se previamente no HPLC concentrações conhecidas de MDA-

TBA. Os dados foram expressos em pmol de TBARS/g tecido (TBARS: thiobarbituric acid reactive substances).

Na Figura 4 pode-se observar o cromatograma (HPLC/UV/VIS) obtido dos picos da curva de concentrações conhecidas de TBA-MDA previamente injetadas que foram utilizadas para a quantificação dos níveis de MDA nas brânquias de *Danio rerio*.

Figura 3. 4 - Cromatograma mostrando os picos da curva de concentrações conhecidas de TBA-MDA previamente injetadas em HPLC/UV/VIS e que foram utilizadas para a quantificação dos níveis de MDA nas brânquias de *Danio rerio*

3.3.4 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas é necessária para o cálculo final das atividades enzimáticas, e foi realizada pelo método de Bradford (1976). Este método baseia-se na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue/G-250 (Bradford Reagent/Sigma-Aldrich) com as moléculas de proteínas da amostra formando um complexo de cor azul que é medido em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração das proteínas foi determinada com base na curva de calibração com concentrações conhecidas de soro albumina bovina (BSA).

3.4 Análises químicas e variáveis físico-químicas

As concentrações de abamectina e difenoconazol nas soluções estoques foram quantificadas a fim de confirmar as concentrações nominais dos testes, conforme descrito no APÊNDICE D. Algumas variáveis físico-químicas foram analisadas na água no início e no final dos experimentos, como a temperatura (°C), pH (Mi-cronal B374 potentiometer), oxigênio dissolvido (OD YSI meter) e concentração de amônia (HANSEN; KOROLEFF, 1999). As médias $\pm$ desvio padrão dos parâmetros encontram-se no APÊNDICE C - Variáveis físico-químicas dos experimentos com adultos de *Danio rerio*.

3.5 Análise estatística dos dados

Os dados das atividades enzimáticas e os parâmetros de estresse oxidativo foram comparados estatisticamente entre os grupos utilizando o programa Statistica 7.0. Foram realizados testes para verificar se os dados são normais (Shapiro-Wilk), homogêneos (Levene), e os parâmetros bioquímicos entre os diferentes tratamentos e concentrações foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo post-hoc Fisher LSD, em casos de dados paramétricos. Para dados não paramétricos utilizou-se o teste Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc Student-Newman-Keuls. A análise do efeito integrado de todos os biomarcadores foi realizada pelo IBR (*Integrated Biomarker Response*), desenvolvido por Beliaeff e Burgeot (2002), e adaptado por Sanchez, Burgeot e Porcher (2013), como IBR v2 (versão 2). Diferenças significativas entre os grupos foram aceitas com $p < 0,05$.

4. Resultados e discussão

4.1 Biomarcadores

A partir dos dados da Tabela 2 e dos gráficos da Figura 5 pode-se observar um aumento em relação ao controle na atividade da enzima de biotransformação de fase I EROD nas brânquias dos organismos expostos por 48h ao ingrediente ativo abamectina, à formulação comercial Kraft 36EC® e às misturas Kraft 36EC® + Score 250EC®. Não foram observadas diferenças significativas nas respostas da UDPGT, porém houve um aumento na atividade da enzima de biotransformação de fase II GST, uma vez que foram observadas diferenças significativas da atividade desta enzima nas brânquias dos organismos expostos ao difenoconazol, ao Score 250EC® e às misturas Kraft 36EC® + Score 250EC® quando comparados com controle. Com relação às atividades das enzimas de defesa antioxidante, não foram observadas diferenças significativas na atividade da Catalase, porém um aumento significativo na atividade da GPx e diminuição na atividade da GR foram observados nas brânquias dos organismos expostos ao difenoconazol, ao Score 250EC®, às misturas de abamectina + difenoconazol e de Kraft 36EC® + Score 250EC®. A diminuição na atividade da GR também foi observada no controle do solvente. Por fim, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de produtos primários da lipoperoxidação (HL), porém um aumento significativo nos níveis de MDA em relação ao controle foi observado nos organismos expostos ao Kraft 36EC®, ao Score 250EC®, às misturas de abamectina + difenoconazol e de Kraft 36EC® + Score 250EC®.

Tabela 3. 2 - Dados das atividades das enzimas de biotransformação etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glucuronil-transferase (UDPGT) e glutathione – S – transferase (GST); das enzimas de defesa antioxidante catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR); e peroxidação lipídica pela medida dos níveis malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (HL) analisados em brânquias de *Danio rerio* expostos por 48h às CENO de cada composto. As médias e desvios estão expressos em nmol/min/mg de proteína (EROD, UDPGT, HL e MDA) e U/mg de proteína (GST, CAT, GPx e GR). * Diferenças estatisticamente significativas

	EROD	UDPGT	GST	CAT	GPx	GR	HL	MDA
Controle	807,26±168,11	79,99±7,99	0,79 ± 0,09	30,71 ± 13,5	0,33±0,08	0,86±0,21	0,215±0,019	3,82 ± 0,76
Controle solvente	1211,91±333,64	98,15±13,20	0,69 ± 0,16	26,25 ± 13,32	0,49±0,14	0,48±0,17*	0,199±0,028	5,48 ± 0,67
Abamectina	1803,01±670,47*	84,32±5,96	0,58 ± 0,14	21,83 ± 8,35	0,40±0,05	0,63±0,17	0,203±0,030	5,10 ± 0,61
Kraft 36EC®	2123,50±1309,97*	87,45±14,87	1,08 ± 0,23	38,15 ± 14,05	0,46±0,10	0,37±0,04	0,176±0,014	8,62 ± 2,26*
Difenoconazol	1218,52±317,20	115,46±29,07	1,14 ± 0,12*	34,44 ± 9,56	0,65±0,07*	0,30±0,07*	0,226±0,063	4,45 ± 0,23
Score 250EC®	961,82±531,22	72,59±18,63	1,20 ± 0,24*	43,74 ± 7,79	0,58±0,20*	0,21±0,01*	0,178±0,017	12,5 ± 0,86*
Aba + Difeno	1285,69±500,76	89,02±38,41	1,07 ± 0,29	34,9 ± 18,57	0,54±0,06*	0,22±0,03*	0,182±0,027	8,75 ± 1,17*
Kraft 36EC® + Score 250EC®	1878,66±1323,45*	98,47±27,66	1,54 ± 0,20*	47,68 ± 15,95	0,73±0,22*	0,31±0,06*	0,213±0,082	10,6 ± 3,41*

Figura 3. 5 – Gráficos das atividades das enzimas de biotransformação etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glucuronil-transferase (UDPGT) e glutatona – S – transferase (GST); das enzimas de defesa antioxidante catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR); e peroxidação lipídica pela medida dos níveis malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (HL) analisados em brânquias de *Danio rerio* expostos por 48h às CENO de cada composto

Os aumentos nas atividades das enzimas de biotransformação EROD e GST mostram que o sistema de detoxificação do *Danio rerio* expostos aos contaminantes foi ativado a fim de transformar os compostos absorvidos em compostos mais solúveis e assim facilitar a excreção dos tóxicos. Aparentemente, a abamectina e sua formulação comercial Kraft 36EC® parecem ativar a via de metabolização de fase I (EROD), enquanto que o difenoconazol e sua formulação comercial Score 250EC® ativam a via de fase II (GST) (Figura 5).

De fato, estudos anteriores utilizando mamíferos, como ratos e ruminantes (SKÁLOVÁ et al., 2001), mostram que os citocromos P450 são as principais enzimas de metabolização de ivermectinas, e são conhecidas por aumentar a atividade da CYP1A (EROD) (ZENG et al., 1998). Entretanto, estudos anteriores mostram uma diminuição na atividade da GST em embriões de *Danio rerio* expostos a ivermectina (DOMINGUES et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016), o que não foi observado significativamente no presente estudo.

Apesar de não ter alterado significativamente o sistema de defesa antioxidante, a exposição dos organismos à formulação comercial da abamectina produziu ERO durante a biotransformação dos compostos (evidenciado pelo aumento da EROD). Essas ERO não balanceadas pelas enzimas antioxidantes possivelmente atacaram às membranas celulares causando o estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento dos níveis de MDA nas brânquias dos organismos expostos ao Kraft 36EC®. Relatos sobre estresse oxidativo em peixes causados pela exposição à abamectina são escassos. Entretanto, estudos com aves da espécie *Columba livia* mostram o estresse oxidativo causado pela exposição dos organismos a ivermectinas (LIU et al., 2014; ZHU et al., 2013). Um aumento nos níveis de MDA, indicativo de estresse oxidativo em caracóis *Physella acuta* expostos a avermectinas, também foi observado em estudos anteriores (MA et al., 2014).

Os estudos envolvendo peixes expostos ao difenoconazol mostram que este composto normalmente ativa as vias de detoxificação EROD e GST (ZHANG et al., 2017). Neste caso, somente a GST teve sua atividade aumentada e esta atividade de biotransformação do difenoconazol possivelmente gerou espécies reativas de oxigênio (ERO) no metabolismo dos organismos expostos, pois apesar de não ter alteração na atividade da enzima de defesa antioxidante catalase, foram observadas alterações nas enzimas GPx e GR. O aumento da GPx e a diminuição da GR mostram que um excesso de ERO foram geradas e que a capacidade antioxidante dos organismos expostos ao difenoconazol, sua formulação comercial e às misturas foi afetada.

Diante do exposto, o estresse oxidativo também ocorreu nos organismos expostos ao Score 250EC® e às misturas, uma vez que houve um aumento significativo nos níveis de

MDA nas brânquias. Possivelmente, o excesso de ERO geradas na biotransformação não foram eficientemente combatidas pelas defesas antioxidantes, causando a peroxidação lipídica e consequente estresse oxidativo. Estudos anteriores também observaram ocorrência de estresse oxidativo em adultos de *Danio rerio* expostos ao difenoconazol evidenciado pelo aumento dos níveis de MDA (MU et al., 2015).

O MDA é um aldeído muito utilizado como biomarcador por ser um produto secundário da peroxidação lipídica, causada pelo ataque de espécies reativas de oxigênio (ERO). Um excesso de ERO pode ser gerado quando os organismos são expostos a compostos tóxicos e acabam absorvendo e metabolizando estes produtos. Quando suas defesas antioxidantes não são suficientes para combater o ataque das ERO ocorre a peroxidação lipídica, gerando então o estresse oxidativo.

Tendo isto em vista, um aumento significativo nos níveis de MDA de determinados organismos sinaliza um estado de alerta de contaminação na forma de resposta metabólica que precede um dano irreversível como a letalidade (NOGUEIRA et al., 2015). Com isto, por meio da análise de biomarcadores como o MDA, é possível detectar se concentrações consideradas ‘seguras’, ou de efeito não observado (CENO) nos testes comuns de toxicidade, promovem prejuízos aos organismos a nível metabólico.

Além das respostas biológicas individuais de cada biomarcador foi avaliado também o índice integrativo IBRv2 (*Integrated Biomarker Response version 2*) de Sanchez, Burgeot e Porcher (2013). Estes cálculos são baseados no conceito do desvio de referência. O teste IBRv2 usa resultados do controle para determinar os valores de outros grupos e o número IBR é a soma do desvio de cada parâmetro. A Figura 6 mostra o gráfico de barras com os dados de IBRv2 e diferenças significativas em relação ao controle estão identificadas por *.

Figura 3. 6 – Gráfico das diferenças significativas do IBR v2 calculados em relação ao controle

Pode-se observar que as exposições às formulações comerciais e às misturas são as que influenciam significativamente nas alterações dos biomarcadores testados, segundo a análise do IBR.

A fim de melhor observar os resultados de IBR, na Figura 7 foram construídas as *starplots* com a média do valor de cada tratamento. Esta forma de análise contribui para observar quanto o grupo tratado diferiu do controle. Assim, pode-se observar pelas *starplots* os efeitos dos tratamentos nos diferentes biomarcadores analisados em relação ao controle (FELÍCIO et al., 2018; SANCHEZ; BURGEOT; PORCHER, 2013). Se a linha vermelha dos tratamentos estiver fora da azul, o parâmetro analisado foi aumentado; e se a linha vermelha estiver dentro da azul, o parâmetro foi diminuído, comparado ao grupo controle. Alguns biomarcadores como GPx, GR e HL foram retirados da análise de IBR a fim de melhorar a força estatística e possibilitar uma melhor visualização dos resultados pelas *starplots*.

Figura 3. 7 – *Starplots* construídas a partir da análise do IBR mostrando a influência em relação ao controle das respostas de cada biomarcador nas diferentes exposições

Embora pela *starplot* da Figura 7 possa ser observada uma maior atividade das enzimas de biotransformação EROD e UDPGT nos organismos expostos ao controle do solvente, este efeito não é significativo, como mostra o gráfico de barras do IBR da Figura 6.

Os valores significativos de IBR para as formulações comerciais isoladas e para as misturas, tanto dos princípios ativos quanto das formulações comerciais (Figura 6), também podem ser observadas claramente pelas *starplots*. A partir dos gráficos da Figura 7, para estes tratamentos, nota-se um aumento dos parâmetros de biomarcadores analisados em relação ao controle, exceto pela diminuição da UDPGT no caso do Score 250EC®.

A partir dos resultados de IBR é possível afirmar que as formulações comerciais tanto da abamectina quanto do difenoconazol mostraram-se mais tóxicas ao *Danio rerio* em relação aos ingredientes ativos, pois promoveram maiores efeitos deletérios no metabolismo dos organismos expostos. Estes compostos podem apresentar mais efeitos tóxicos a organismos não alvos que os ingredientes ativos isolados devido principalmente aos diferentes modos de ação (MoA) dos inúmeros compostos aditivos presentes nas formulações comerciais, chamados pelos fabricantes de “compostos inertes” (COORS; FRISCHE, 2011; COX; SURGAN, 2006). Apesar de serem chamados de inertes sabe-se que estes compostos muitas vezes elevam a toxicidade dos produtos formulados em relação aos princípios ativos por aumentar a absorção cutânea, a mobilidade do composto no ambiente, bem como sua persistência (COX; SURGAN, 2006). Além disso, pouco se sabe quais são estes compostos e os efeitos que as misturas dos diferentes ingredientes “inertes” presentes nas formulações comerciais de agrotóxicos podem causar a organismos não alvos.

No Capítulo 1 em que foram utilizadas as formulações comerciais de Kraft 36EC® e Score 250EC®, quando comparadas às toxicidades em relação às exposições com os respectivos ingredientes ativos, não foram observados efeitos significativos que potencializassem ou minimizassem a letalidade dos compostos a adultos de peixes *Danio rerio* quando expostos isoladamente por 48h. Porém, quando avaliado os efeitos destes compostos no metabolismo de *Danio rerio* em concentrações subletais é possível notar a maior toxicidade do Kraft 36EC® e do Score 250EC® em relação aos respectivos ingredientes ativos.

Também por promoverem maiores efeitos deletérios no metabolismo do *Danio rerio* verifica-se a maior toxicidade das misturas, principalmente das formulações comerciais, pelo aumento significativo do IBR e maior resposta dos biomarcadores quando comparados ao controle (Figuras 6 e 7). De fato, efeitos sinérgicos das misturas destes agrotóxicos foram relatados anteriormente com organismos aquáticos (MOREIRA et al., 2017; SANCHES et al., 2017). Os resultados de biomarcadores encontrados neste estudo com *Danio rerio* mostram que o efeito tóxico do Kraft 36EC® e do Score 250EC® é potencializado quando em misturas

até mesmo a níveis metabólicos, o que corrobora com toda a preocupação envolvida a respeito da segurança e risco ambiental envolvendo o uso indiscriminado destes agrotóxicos.

Diante do exposto, o uso destes compostos no ambiente deve ser administrado com cautela, pois são compostos perigosos extremamente tóxicos e que causam efeitos deletérios no metabolismo de detoxificação de organismos não alvo (MOREIRA et al., 2017; OLIVEIRA; BIANCHI; ESPÍNDOLA, 2018; SANCHES et al., 2017).

5. Conclusão

A partir das análises de biomarcadores, utilizando adultos de *Danio rerio*, conclui-se que as formulações comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC® e às misturas são mais perigosas quando comparado aos ingredientes ativos isolados, pois promovem alterações significativas no metabolismo de detoxificação dos organismos expostos e causam estresse oxidativo em peixes.

REFERÊNCIAS

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes**, 2016.

ALMEIDA, E. A. DE; RIBEIRO, C. A. DE O. **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems**. [s.l.] Group, Taylor & Francis, 2014. 402p.

BEUTLER, E. Catalase. In: **A Manual of Biochemical Methods**. Red Cell M ed. New York: 1976. p. 89 – 90.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248–54, 1976.

CHAMBERS, J. E. et al. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 8, n. 1, p. 165–176, 2002.

CHEMINOVA. **KRAFT 36EC®**. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/kraft.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

CLARKE, D. J.; GEORGET, S. G.; BURCHELL, B. Multiplicity of UDP-glucuronosyltransferases in fish. **Biochemical Journal**, v. 284, p. 417–423, 1992.

COORS, A.; FRISCHE, T. Predicting the aquatic toxicity of commercial pesticide mixtures. **Environmental Sciences Europe**, v. 23, n. 1, p. 1–18, 2011.

COSTANTINI, D. Redox physiology in animal function: The struggle of living in an oxidant environment. **Current Zoology**, v. 56, n. 6, p. 687–702, 2010.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803–1806, 2006.

DOMINGUES, I. et al. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 338–345, 2010.

DOMINGUES, I. et al. Effects of ivermectin on *Danio rerio*: a multiple endpoint approach: behaviour, weight and subcellular markers. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 491–499, 2016.

FELÍCIO, A. A. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, n. December 2017, p. 248–256, 2018.

FRASCO, M. F.; GUILHERMINO, L. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 149–156, 2002.

GHISI, N. C. et al. Multivariate and integrative approach to analyze multiple biomarkers in ecotoxicology: A field study in Neotropical region. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 1208–1218, 2017.

GRAVATO, C. et al. Using a multibiomarker approach and behavioural responses to assess the effects of anthracene in *Palaemon serratus*. **Aquatic Toxicology**, v. 149, p. 94–102, 2014.

HANSEN, H. P.; KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSHOF, K.; KREMLING, K.; EHRHARDT, M. (Eds.). **Methods of Seawater Analysis**. Third, Com ed.

WILEY-VCH Verlag GmbH, 1999. p. 159–228.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

KROON, F.; STRETEN, C.; HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–43, 2017.

LIU, C. et al. Effects of avermectin on immune function and oxidative stress in the pigeon spleen. **Chemico-Biological Interactions**, v. 210, n. 1, p. 43–50, 2014.

MA, J. et al. Biochemical responses to the toxicity of the biocide abamectin on the freshwater snail *Physa acuta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 101, n. 1, p. 31–35, 2014.

MEECH, R.; MACKENZIE, P. I. Structure and Function of Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferases. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, n. February, p. 907–915, 1997.

MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58–66, 2017.

MU, X. et al. Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio reio*) during different life stages. **Aquatic Toxicology**, v. 160, p. 57–68, 2015.

NOGUEIRA, L. et al. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 97–105, 2011.

NOGUEIRA, L. et al. Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5. **Chemosphere**, v. 134, p. 210–216, 2015.

OLIVEIRA, R. et al. Multilevel assessment of ivermectin effects using different zebra fish

life stages. **Comparative Biochemistry and Physiology , Part C**, v. 187, p. 50–61, 2016.

OLIVEIRA, V. B. M.; BIANCHI, M. O.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Hazard assessment of the pesticides KRAFT 36 EC and SCORE in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9999, n. 9999, p. 1–6, 2018.

SANCHES, A. L. M. et al. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, p. 582–587, 2017.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. M. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 2721–2725, 2013.

SIES, H. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, n. 2, p. 287–290, 1979.

SKÁLOVÁ, L. et al. Effect of ivermectin on activities of cytochrome P450 isoenzymes in mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*). **Chemico-Biological Interactions**, v. 137, n. 2, p. 155–167, 2001.

STEFANI MARGARIDO, T. C. et al. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 61–67, 2013.

SYNGENTA. **SCORE** ®. Disponível em:
<https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/score_1.pdf?token=1511171921>.
Acesso em: 19 fev. 2018.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Environment International**, v. 28, n. 8, p. 711–717, 2003.

WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 347–570, 2000.

ZENG, Z. et al. Identification of cytochrom e P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes. **Xenobiotica**, v. 28, n. 3, p. 313–321, 1998.

ZHANG, L. et al. Bioaccumulation and the expression of hepatic cytochrome P450 genes in marine medaka (*Oryzias melastigma*) exposed to difenoconazole. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 52, p. 98–104, 2017.

ZHU, W. J. et al. Avermectin induced liver injury in pigeon: Mechanisms of apoptosis and oxidative stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 74–81, 2013.

Capítulo 4

Análise de biomarcadores em brânquias de *Danio rerio* expostos em mesocosmos ao *runoff* e *spray drift* do inseticida Kraft 36EC® e do fungicida Score 250EC®

Ana Letícia Madeira Sanches ^a, Bruna Horvath Vieira ^a, Marina Vanderlei Reghini ^a, Raquel Aparecida Moreira ^{a, b}, Fabrício Barreto Teresa ^c, Thandy Junio da Silva Pinto ^a, Eduardo Alves de Almeida ^d, Michiel Daam ^{a, e}, Evaldo L.G. Espíndola ^a

a NEEA/CRHEA/SHS, Escola de Engenharia de São Carlos, Av. Trabalhador São Carlense, 400, 13.560-970 São Carlos, Brasil

b Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luis, Km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brasil

c UEG – Universidade do Estado de Goiás, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UnUCET), Anápolis, Goiás, Brasil

d Departamento Química e Ciências Ambientais, IBILCE/UNESP - Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15.054.000 São José do Rio Preto, SP, Brasil

e CENSE, Departamento de Engenharia e Ciências Ambientais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal

RESUMO

A ocorrência do escoamento superficial *runoff* contaminado com agrotóxico em ecossistemas tropicais após as aplicações no campo acaba influenciando na toxicidade desses compostos a organismos não alvos. Além disso, a contaminação por aspersão direta (*spray drift*), resultante da pulverização aérea nos campos agrícolas próximo aos corpos hídricos, é também significativa e pode afetar os ecossistemas aquáticos inseridos nesta matriz agrícola. Com isto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do *runoff* e *spray drift* dos agrotóxicos Kraft 36EC® e Score 250EC®, isolados e em misturas, em adultos de *Danio rerio* após exposição aguda (96h) em mesocosmos (modelos ecossistêmicos), por meio de biomarcadores de contaminação aquática analisados nas brânquias dos peixes. Pelos resultados obtidos foram verificadas poucas alterações nas atividades enzimáticas quando avaliadas isoladamente, destacando somente a inibição das enzimas antioxidantes catalase e glutatona redutase e ocorrência do estresse oxidativo (níveis de MDA) nos organismos expostos ao Kraft 36EC® *spray drift*. A partir da análise de IBR (*Integrated Biomarker Response*), observou-se que a exposição ao Kraft 36EC® *spray drift* em campo promove os maiores efeitos deletérios no metabolismo de *Danio rerio*, seguido das exposições ao *runoff* contaminado com Kraft 36EC® e Score 250EC®. Diferenças no padrão de respostas dos biomarcadores entre os experimentos realizados em mesocosmos e em laboratório ficam evidentes devido à influência das concentrações utilizadas, das interações ecológicas entre as comunidades presentes no meio e das variáveis ambientais nos experimentos em mesocosmos.

Palavras-chave: *runoff*, *spray drift*, mesocosmos, modelos ecossistêmicos

1. Introdução

A região de Bom Repouso, pequeno município de Minas Gerais, Brasil, é considerada nacionalmente como uma das principais produtoras de morango. Com prática agrícola expressiva e crescente, o aumento do uso de agrotóxicos nos campos de cultivo para o controle de pragas e de plantas daninhas contamina o ambiente e gera impactos negativos a saúde humana e também aos organismos não alvos (ESPÍNDOLA, 2011; MOREIRA et al., 2017; SILVA, 2016).

Localizado junto à bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu, a situação deste município é considerada crítica, e estudos nesta região vêm sendo conduzidos pelo Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), desde o ano 2000. Baseados em parâmetros limnológicos, ecotoxicológicos e socioambientais, os estudos mostram que essa região vem sofrendo sérias consequências pelo uso excessivo de agrotóxicos (BRAUN et al., 2012; CASALI-PEREIRA et al., 2015; ESPÍNDOLA, 2011; MENDES, 2015; NOVELLI et al., 2012a, 2012b, 2016; NUNES; ESPÍNDOLA, 2012; VASCONCELOS et al., 2016; VIEIRA, 2010).

No estudo realizado por Silva (2016), verificou-se que os principais agrotóxicos atualmente utilizados nas culturas de morango nas áreas agrícolas de Bom Repouso são o inseticida Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e o fungicida Score 250EC® (i.a. difenoconazol). Pesquisas recentes envolvendo o uso destes agrotóxicos mostram os efeitos tóxicos destes compostos em diferentes organismos não-alvos como algas, macroinvertebrados, cladóceros, peixes e diferentes organismos terrestres (MOREIRA et al., 2017; OLIVEIRA; BIANCHI; ESPÍNDOLA, 2018; SANCHES et al., 2017; VANDERLEI, 2015).

Inseticidas e fungicidas são a segunda e terceira classes de agrotóxicos mais utilizados no Brasil, e em um estudo recente realizado com apenas 11% do total de ingredientes ativos aprovados no Brasil, foi observado efeito tóxico a organismos aquáticos em pelo menos 59% das amostras de água coletadas em cinco estados brasileiros diferentes (ALBUQUERQUE et al., 2016). Além do uso de agrotóxicos e da elevada toxicidade dos mesmos, as características geoclimáticas de determinadas regiões tropicais, como a de Bom Repouso, intensificam os riscos ambientais.

Países tropicais, como o Brasil, possuem um regime pluviométrico intenso, influenciando de forma significativa no destino desses compostos. As altas taxas de precipitação, declives acentuados e o consequente escoamento superficial (*runoff*) favorece o transporte de agrotóxicos aos mananciais locais (DAAM; VAN DEN BRINK, 2010;

NOVELLI et al., 2012b; SANCHEZ-BAYO; HYNE, 2011). Além da contaminação pelo escoamento superficial (*runoff*), as más práticas agrícolas são fontes importantes de contaminação.

O mau uso, armazenamento e lavagem de embalagens de agrotóxicos podem contaminar os mananciais locais em concentrações muito elevadas, podendo provocar danos irreversíveis nos organismos aquáticos não alvo. A contaminação por aspersão direta (*spray drift*), consequente da pulverização aérea nos campos agrícolas próximo aos corpos hídricos, é também significativa e pode comprometer todo o ecossistema aquático local (DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; MOREIRA et al., 2017; NOVELLI et al., 2016; OLIVEIRA; BIANCHI; ESPÍNDOLA, 2018; SILVA, 2016). Com isso, programas de monitoramento das regiões mais atingidas por cargas de resíduos de agrotóxicos, como é o caso de Bom Repouso (MG), são extremamente importantes a fim de avaliar o risco e garantir a segurança da vida aquática local, além da saúde humana.

Estudos ecotoxicológicos, são em sua maioria, realizados em experimentos de laboratório, e apesar da importância desses ensaios, os efeitos esperados em sistemas naturais são mal estimados. Em laboratório não são considerados, por exemplo, a complexidade do ambiente aquático nem as interações entre as diferentes populações, as quais são essenciais para a compreensão dos efeitos dos contaminantes no ambiente aquático (CAQUET et al., 1996). Os ecossistemas naturais apresentam características bióticas e abióticas que influenciam no comportamento dos poluentes e, conseqüentemente, as respostas das diferentes espécies após um evento de contaminação. Estudos realizados em condições mais realistas ao ambiente natural são mais efetivos na compreensão dos diferentes processos que ocorrem no ecossistema após adição de um contaminante (CAQUET et al., 1996; NOVELLI et al., 2012b; NOWELL et al., 2018).

Ensaio ecotoxicológicos realizados *in situ*, ou em modelos ecossistêmicos (micro e mesocosmos), representam uma situação de exposição sob condições mais realistas em que as variáveis ambientais não são controladas, e fornecem resultados ecologicamente mais relevantes. Mesocosmos são, portanto, ecossistemas artificiais em menor escala mantidos sob condições naturais, e que são facilmente amostrados para a avaliação dos efeitos ambientais (CAQUET et al., 1996; LAABS et al., 2007). Porém, ensaios *in situ* ou em condições seminaturais (mesocosmos) possuem a desvantagem de terem altos custos de execução, dificuldades na instalação e manutenção dos sistemas, além do baixo número de réplicas possíveis de realizar. Apesar disso, sua relevância ecológica é maior e promove uma análise mais realista e uma compreensão mais clara dos efeitos do contaminante no ambiente

(CAQUET et al., 1996; MENDES, 2015). A partir dos dados gerados considerando os modelos ecossistêmicos associados aos dados obtidos em experimentos laboratoriais, são geradas informações mais completas que podem ser consideradas na avaliação dos riscos de contaminação ambiental. Muitos são os estudos realizados com mesocosmos, e estes são considerados uma ferramenta útil em pesquisas ecotoxicológicas (CAQUET et al., 1996; LAABS et al., 2007; MOREIRA et al., 2017; NOVELLI et al., 2012b).

Outra ferramenta importante em ensaios ecotoxicológicos são os biomarcadores bioquímicos, que são utilizados para avaliar o efeito tóxico de substâncias poluentes em corpos aquáticos e a relação dose-efeito nos organismos. A partir da análise de biomarcadores é possível identificar, a níveis metabólicos, os efeitos subletais deletérios de diferentes compostos em organismos aquáticos logo nos primeiros dias da exposição. Biomarcadores são importantes ferramentas indicadoras de contaminação medidos em fluidos e tecidos dos organismos expostos, pois atuam como um sistema de aviso precoce (ALMEIDA; RIBEIRO, 2014; KROON; STRETEN; HARRIES, 2017).

Os biomarcadores podem ser de diferentes tipos como, por exemplo, os parâmetros bioquímicos envolvidos na detoxificação de compostos químicos. Enzimas de biotransformação (EROD, UDPGT e GST), de defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx e GR) e níveis de peroxidação lipídica (HL e MDA) são considerados bons biomarcadores em estudos utilizando diferentes tipos de contaminantes e organismos teste (CHAMBERS et al., 2002; DOMINGUES et al., 2010; FRASCO; GUILHERMINO, 2002; GHISI et al., 2017; GRAVATO et al., 2014; KROON; STRETEN; HARRIES, 2017; STEFANI MARGARIDO et al., 2013; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003). Considerando as contribuições e a importância da análise dos efeitos metabólicos subletais de compostos tóxicos a organismos não-alvos, a análise de biomarcadores em estudos de avaliações de risco é altamente recomendada.

2. Objetivo

Considerando os riscos ecológicos inerentes ao uso de agrotóxicos, o objetivo principal desta pesquisa é avaliar o efeito ambiental dos praguicidas Kraft 36 EC® e Score 250 EC®, isolados e em misturas, em agrossistemas tropicais considerando o escoamento superficial (*runoff*) e o pior cenário, em que 100% do composto aplicado atinge o corpo d'água (*spray drift*).

Os objetivos específicos são:

- Avaliar as atividades das enzimas de biotransformação EROD, UDPGT e GST, de defesa antioxidante CAT, GPx e GR e parâmetros de estresse oxidativo como hidroperóxidos lipídicos e MDA em brânquias de *Danio rerio* expostos por 96h em mesocosmos ao *runoff* e *spray drift* contaminados com Kraft 36 EC® e Score 250 EC® isolados e em misturas, além de calcular o IBR (*Integrated biomarker response*) a fim de avaliar os efeitos e a influência dos diferentes biomarcadores analisados;
- Correlacionar os resultados obtidos em semicampo (mesocosmos) com os dados do experimento de laboratório a fim comparar os efeitos tóxicos gerados e avaliar a viabilidade e relevância ecológica dos experimentos de campo com a influência de variáveis ambientais interferentes não controladas.

3. Material e métodos

O delineamento experimental foi desenvolvido com o objetivo de verificar os efeitos da toxicidade dos agrotóxicos Kraft 36 EC® e Score 250 EC® na estrutura e funcionamento de ecossistemas naturais (mesocosmos), a partir de duas formas de contaminação do sistema aquático: o aporte indireto do contaminante ao ecossistema aquático (aplicação prévia do contaminante no solo e carreamento ao corpo hídrico pelo *runoff*) e a adição direta do contaminante no ecossistema aquático (aplicação diretamente no corpo hídrico simulando o *spray drift*).

3.1 Montagem e estabilização dos mesocosmos

O experimento de mesocosmos foi realizado nas dependências do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA/EESC/USP). Em setembro de 2014, 26 tanques experimentais (mesocosmos) foram montados em caixas d'água de polipropileno (500L cada), não enterradas, onde foram adicionados 10 cm de solo terrestre e água de poço artesiano. Mangueiras e bombas foram instaladas nos tanques a fim de garantir a troca de água e melhor homogeneização dos mesocosmos durante o período de estabilização (Figura 1).

Figura 4. 1 – Imagens dos tanques de mesocosmos sendo montados

Posteriormente, foram adicionadas nestes sistemas amostras de biota coletadas na Represa do 29 (São Carlos, SP) e na Lagoa Dourada (Itirapina, SP), a fim de enriquecer ecologicamente o sistema e garantir relevância ecológica ao estudo (Figura 2A, 2B, 2C e 2D). Foram sete meses de manutenção, em que foram medidos diariamente (multisonda Horiba U-10) parâmetros como pH, condutividade, temperatura e oxigênio dissolvido de cada tanque (Figura 2E). Além disso, para garantir a homogeneidade entre os tanques durante a fase de estabilização, os mesocosmos permaneceram interligados e foi mantido um fluxo entre eles por meio de bombas submersas (Figura 2F). Durante as exposições aos contaminantes esse fluxo foi interrompido. Após a estabilização dos mesocosmos, em março de 2015, os peixes (adultos de *Danio rerio*) foram inseridos nestes sistemas, três dias antes da contaminação, em gaiolas fabricadas com canos de PVC abertos nas laterais e revestidos por telas de poliéster para que os organismos fossem mantidos dentro das mesmas. Foram inseridas três gaiolas em cada mesocosmo, contendo em cada uma delas três peixes adultos de $2,8 \pm 0,3$ cm e $0,45 \pm 0,1$ g em média (Figura 2G e 2H).

Figura 4. 2 – Fotos com os detalhes da montagem e estabilização dos mesocosmos. A: Foto dos 26 mesocosmos montados em caixas d'água de 500L. B: Foto da coleta de diferentes comunidades realizada em uma das represas. C: Foto do momento em que as comunidades coletadas foram adicionadas aos tanques. D: Foto das macrófitas coletadas inseridas no sistema. E: Foto da medida de parâmetros físico-químicos realizados com o multisonda Horiba. F: Foto mostrando as bombas submersas e as mangueiras que interligam um tanque ao outro. G e H: Foto das gaiolas em que os peixes foram inseridos nos tanques. Fotos por: Evaldo Luiz G. Espíndola

3.2 Simulador de *runoff* e *spray drift*

Após a estabilização do sistema montou-se os experimentos para a obtenção do *runoff* utilizado na contaminação dos mesocosmos. Para isso, foi simulada uma situação de plantio, com aplicação dos agrotóxicos, e os consequentes efeitos da precipitação: transporte de material (partículas de solo, organismos e contaminantes) para o ecossistema aquático via *runoff*. Os praguicidas Kraft 36EC® e Score 250EC®, isolados e em misturas, foram aplicados em parcelas de solo arado e desprovido de vegetação, nas concentrações recomendadas pelos fabricantes nas culturas de morango (Figura 3A e 3B). Houve ainda uma parcela que foi borrifada apenas com água, na mesma quantidade usada para a diluição do agrotóxico. O objetivo deste procedimento foi obter um *runoff* controle (não contaminado) e *runoff* contaminado com os agrotóxicos para verificar se as possíveis alterações seriam provenientes do *runoff* (aumento da turbidez e concentração de nutrientes, por exemplo) dos agrotóxicos ou de ambos. A aplicação dos produtos foi feita com o auxílio de um pulverizador costal, e as concentrações utilizadas foram às recomendadas pelo fabricante para o cultivo de morango: que para o Kraft 36EC® é de 30 mL/100 L de água, o que corresponde a 0,1 L/m² de calda, e para o Score 250EC® é 0,40 mL/100 L, o que corresponde a 0,020L/m² do produto.

Após a contaminação do solo com os praguicidas foi simulada uma chuva torrencial típica de verão em países tropicais, como o Brasil. A média pluviométrica foi baseada em uma série de dados obtidos na estação climatológica do CRHEA. A chuva foi simulada a partir de chuveiros instalados acima do solo (Figura 3C e 3D), e as amostras de *runoff* contendo todo material carreado (contaminantes e partículas do solo) foram coletadas para as contaminações dos mesocosmos (Figura 3E). Logo após a obtenção do *runoff*, os mesocosmos receberam a contaminação deste material na proporção de 10% de *runoff* em relação ao volume total dos mesocosmos (250 L) (Figura 3E). Além da contaminação por *runoff*, houve também aplicação direta na água dos produtos comerciais (*spray drift* – simulando um pior cenário em que 100% do agrotóxico aplicado atinge os corpos hídricos - Figura 3F). Esta aplicação direta foi feita com o auxílio de um borrifador/pulverizador, em que as caldas dos agrotóxicos, novamente preparadas seguindo as recomendações dos fabricantes para a cultura de morango, foram aplicadas proporcionalmente à área da caixa experimental (mesocosmos).

Figura 4. 3 – Fotos com os detalhes da simulação do *runoff* e contaminação dos mesocosmos por *spray drift*. A:

Foto das parcelas de terra preparadas para receber a aplicação dos agrotóxicos. Detalhe para os recipientes instalados abaixo das parcelas para captação da água de *runoff*. B: Foto da aplicação das caldas dos agrotóxicos nas concentrações recomendadas pelos fabricantes para a cultura de morando (Kraft 36EC® = 30 mL/100 L de água, o que corresponde a 0,1 L/m² de calda; Score 250EC® = 0,40 mL/100 L o que corresponde a 0,020 L/m² do produto. C: Foto dos chuveiros instalados acima das parcelas de solo para a simulação da chuva torrencial. D: Foto do momento da simulação da chuva nas três parcelas simultaneamente. E: Foto do momento em que a água de *runoff* coletada da simulação foi adicionada aos mesocosmos. F: Foto do momento em que o tratamento de *spray drift* foi aplicado no mesocosmos. Fotos por: Evaldo Luiz G. Espíndola

No total foram oito grupos experimentais: controle (sem adição de nenhum tratamento), controle do *runoff* (água de *runoff* sem aplicação de nenhum dos agrotóxicos), Kraft 36EC® *runoff*, Score 250EC® *runoff*, Kraft 36EC® + Score 250EC® *runoff*, Kraft 36EC® *spray drift*, Score 250EC® *spray drift* e Kraft 36EC® + Score 250EC® *spray drift*. Devido à inviabilidade espacial e econômica foram feitas apenas três réplicas de cada grupo, exceto os controles (quatro réplicas cada).

3.3 Organismo teste e aclimação

Todas as informações sobre a obtenção dos organismos testes, aclimação, biometria e testes de sensibilidade com o sal de referência cloreto de potássio (KCl) realizados são as mesmas descritas no Capítulo 1 e no APÊNDICE C – Aclimação, biometria e testes de sensibilidade com adultos de *Danio rerio*.

3.4 Análises físico-químicas e limnológicas da água dos mesocosmos

Após a montagem do experimento e contaminação dos tanques deu-se início as atividades seguintes envolvendo coleta de amostras de água para a determinação de algumas variáveis físicas, químicas e biológicas. As análises realizadas para a caracterização da água dos mesocosmos estão descritas na Tabela 1.

Tabela 4. 1 - Parâmetros, variáveis e seus respectivos métodos utilizados nas análises da água dos mesocosmos coletada ao longo da contaminação

Parâmetros/Variáveis	Equipamentos/Métodos	Referências
pH	Multisensor HORIBA U-10	-
Temperatura (°C)	Multisensor HORIBA U-10	-
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	Multisensor HORIBA U-10	-
Condutividade Elétrica (µS/cm)	Multisensor HORIBA U-10	-
Material em Suspensão total (mg/L)	Gravimetria em filtros GF/C Whatman, 0,45 µm	(APHA, 1999)
Alcalinidade (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	Titulação	(GOLTERMAN; CLYMO; OHNSTAD, 1978)
Turbidez (NTU)	Espectrofotômetro Hack DR2000	-
Material em suspensão e suas frações	Gravimétrico	(TEIXEIRA; TUNDISI; KUTNER, 1965)
Íon Amônio (µg/L)	Espectrofotometria	(KOROLEFF, 1976)
Nitrato e Nitrito (µg/L)	Espectrofotometria	(MACKERETH; HERON; TALLING, 1978)
Nitrogênio Orgânico Total (mg/L)	Espectrofotometria	(APHA, 1999)
Fósforo Total e Dissolvido (µg/L)	Espectrofotometria	(APHA, 1999)
Fosfato Inorgânico (µg/L)	Espectrofotometria	(APHA, 1999)
Silicato (µg/L)	Espectrofotometria	(GOLTERMAN; CLYMO; OHNSTAD, 1978)
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	Espectrofotometria	(NUSCH, 1980)

Para a realização destas análises, amostras de água dos mesocosmos foram coletadas por sifonamento, em diferentes profundidades, e foram acondicionadas em garrafas de polietileno previamente lavadas com HNO_3 10%. Posteriormente, as amostras foram separadas em duas frações, sendo uma congelada para posterior análise de nutrientes totais e a outra filtrada em filtro de fibra de vidro GF/C com abertura de 0,45 μm , para posterior determinação dos nutrientes dissolvidos. O filtro foi usado para a determinação de clorofila *a*. Para a análise de material em suspensão as amostras coletadas também foram filtradas em filtro de fibra de vidro GF/C com abertura de 0,45 μm . Algumas variáveis foram ainda medidas em campo, como temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido.

As análises de todas as variáveis listadas na Tabela 1 das amostras de água dos mesocosmos foram realizadas no laboratório de Limnologia do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP), localizado no município de Itirapina, SP. As tabelas com as médias $\pm$ desvio padrão dos resultados das análises podem ser observadas no APÊNDICE C - Variáveis físico-químicas dos experimentos com adultos de *Danio rerio* - experimento mesocosmos.

3.5 Quantificações e concentrações dos agrotóxicos

Devido aos problemas com o detector de massas, discutidos no APÊNDICE D, não foi possível quantificar as concentrações reais dos agrotóxicos presentes na água do *runoff* e nem dos mesocosmos. Entretanto, temos a confirmação da concentração nominal dos princípios ativos presentes na calda dos compostos formulados e aplicados no solo e no *spray drift*. A metodologia e os resultados destas análises estão descritos detalhadamente no APÊNDICE D.

Devido a este imprevisto, foram calculadas concentrações teóricas de abamectina e difenoconazol presentes nos tanques dos mesocosmos após a contaminação com *runoff* (concentração teórica considerando a diluição do tanque (10%), e considerando que todo ingrediente ativo aplicado no solo estivesse presente no *runoff*, ou seja, zero retenção no solo - situação fictícia drástica). As concentrações de CL_{50} e CENO de cada tratamento, obtidos em testes preliminares, e as concentrações teóricas dos compostos no *runoff* e no *spray drift* podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 4. 2 - Tabela com valores de CL₅₀ e CENO de cada composto obtidos nos testes de toxicidade preliminares, além dos valores teóricos calculados das concentrações de abamectina e difenoconazol presentes nos produtos comerciais Kraft 36EC® e Score 250EC®, respectivamente, utilizados nos mesocosmos nas exposições com o *runoff* e *spray drift*

Tratamentos	CL ₅₀	CENO	Conc. mesocosmos (<i>runoff</i>) *	Conc. mesocosmos (<i>spray drift</i>)
Abamectina	91 µg/L	20 µg/L	-	-
Kraft 36EC®	72 µg/L	5,4 µg/L	5,6 µg/L	3,5 µg/L
Difenoconazol	2,2 mg/L	1,0 mg/L	-	-
Score 250EC®	1,4 mg/L	0,4 mg/L	10,5 ug/L	6,64 µg/L
Abamectina + Difenoconazol	-	20 µg/L + 0,2 mg/L	-	-
Kraft 36EC® + Score 250EC®	-	5,4 µg/L + 0,8 mg/L	5,6 µg/L + 10,5 ug/L	3,5 µg/L + 6,64 µg/L

* Valores fictícios extrapolados considerando 0% de retenção dos compostos no solo.

A partir de uma análise de distribuição e concentração ambiental prevista utilizando o modelo matemático MacKay para este mesmo estudo de mesocosmos, Vanderlei (2015) mostra que cerca de 4,12% do ingrediente ativo abamectina presente no Kraft 36EC® e 60,6% do difenoconazol presente no Score 250EC® atinge o compartimento aquático.

Em outro trabalho do grupo em que foi possível realizar a quantificação do ingrediente ativo abamectina presente no *runoff* contaminado com o Vertimec® 18EC, Novelli et al. (2016) observaram uma concentração de 44% do ingrediente ativo aplicado presente no *runoff* contaminado, ou seja, menos da metade. Com isso, a concentração teórica dos ingredientes ativos no mesocosmos (*runoff*) em nosso trabalho apresentados na Tabela 2 está superestimada, uma vez que não foram considerados as perdas por retenção dos compostos no solo.

3.6 Biomarcadores bioquímicos

Os peixes foram inseridos nos mesocosmos em gaiolas três dias antes da contaminação para permitir a aclimação dos mesmos. Após 96h da aplicação dos contaminantes os peixes foram retirados dos mesocosmos, anestesiados com fenoxietanol e tiveram suas brânquias dissecadas e congeladas em -80°C, para posterior análise dos biomarcadores propostos.

Todas as análises de biomarcadores foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LBCA), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP (IBILCE), Campus de São José do Rio Preto, sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida. Os biomarcadores analisados nas brânquias de *Danio rerio* foram as

enzimas de biotransformação: 7-etóxioresorufina-O-deetilase (EROD), glucuronosiltransferase (UDPGT) e glutathione-s-transferase (GST); enzimas de defesa antioxidante: glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e catalase (CAT); e parâmetros indicativos de estresse oxidativo: hidroperóxidos lipídicos (HL) e níveis de malondialdeído (MDA). Todos os métodos utilizados nas análises dos biomarcadores, bem como detalhes sobre a homogeneização e preservação das amostras, são os mesmos dos descritos e utilizados nos experimentos do Capítulo 3.

3.7 Análise estatística dos dados

Os dados das atividades enzimáticas e os parâmetros de estresse oxidativo foram comparados estatisticamente entre os grupos utilizando o programa Statistica 7.0. Foram realizados testes para verificar se os dados são normais (Shapiro-Wilk), homogêneos (Levene), e os parâmetros bioquímicos entre os diferentes tratamentos e concentrações foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo post-hoc Fisher LSD, em casos de dados paramétricos. Para dados não paramétricos utilizou-se o teste com Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas entre os grupos foram aceitas com $p < 0,05$. A análise do efeito integrado de todos os biomarcadores foi realizado pelo IBR (*Integrated biomarker response*) desenvolvido por Beliaeff e Burgeot (2002) e adaptado por Sanchez, Burgeot e Porcher (2013) como IBR v2 (versão 2). Foi realizado também análise multivariada agrupando os dados de biomarcadores e variáveis físico-químicas e limnológicas a fim de investigar as influências ambientais nas respostas bioquímicas.

4. Resultados e discussão

4.1 Biomarcadores bioquímicos

A partir dos dados da Tabela 3 e dos gráficos da Figura 4 pode-se observar que não houve alterações significativas em relação ao controle nas atividades das enzimas de biotransformação EROD, UDPGT e GST medidas nas brânquias de *Danio rerio* nos experimentos de mesocosmos, após 96h de exposição. No entanto, verificou-se diminuição na atividade da enzima de defesa antioxidante CAT nos organismos expostos a todos os tratamentos em relação ao controle, inclusive no controle do *runoff*.

Tabela 4. 3 - Dados das atividades das enzimas de biotransformação etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glucuronil-transferase (UDPGT) e glutathione S-transferase (GST); das enzimas de defesa antioxidante catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR); e peroxidação lipídica pela medida dos níveis malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (HL) analisados em brânquias de *Danio rerio* expostos por 96h em mesocosmos ao *runoff* e *spray drift* dos agrotóxicos Kraft 36EC® + Score 250EC®. As médias e desvios estão expressos em nmol/min/mg de proteína (EROD, UDPGT, HL e MDA) e U/mg de proteína (GST, CAT, GPx e GR). * Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle

	EROD	UDPGT	GST	CAT	GPx	GR	HL	MDA
Controle	1792,15±486,57	110,70±17,67	0,94±0,09	62,53±18,93	0,19±0,09	0,68±0,19	0,137±0,009	2,00±0,83
Controle runoff.	1617,64±727,89	128,12±9,43	0,85±0,12	22,01±3,07*	0,25±0,10	0,51±0,12	0,131±0,008	2,32±0,58
Kraft 36EC® runoff	1586,68±1066,51	139,66±14,58	0,90±0,11	9,47±3,54*	0,16±0,04	0,79±0,21	0,136±0,008	3,13±0,30
Score 250EC® runoff	1589,19±631,03	145,26±18,10	0,86±0,10	9,07±0,31*	0,22±0,03	0,51±0,16	0,133±0,010	3,45±1,14
Kraft 36EC® + Score 250EC® runoff	1473,37±580,87	120,77±4,59	0,91±0,09	13,73±4,52*	0,21±0,09	0,69±0,32	0,128±0,003	2,11±0,29
Kraft 36EC® spray drift	1111,52±542,01	100,30±7,54	0,80±0,05	12,50±2,51*	0,29±0,05	0,50±0,26	0,148±0,014	3,66±1,03*
Score 250EC® spray drift	2077,24±209,16	133,18±16,40	0,79±0,08	13,80±5,30*	0,22±0,15	0,30±0,08*	0,141±0,013	1,76±0,41
Kraft 36EC® + Score 250EC® spray drift	790,93±458,52	115,04±8,68	0,96±0,12	20,33±19,88*	0,34±0,14	0,30±0,02*	0,145±0,026	2,02±0,29

Figura 4. 4 – Gráficos das atividades das enzimas de biotransformação etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glucuronil-transferase (UDPGT) e glutatona – S – transferase (GST); das enzimas de defesa antioxidante catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR); e peroxidação lipídica pela medida dos níveis malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (HL) analisados em brânquias de *Danio rerio* expostos por 96h em mesocosmos ao *runoff* e *spray drift* dos agrotóxicos Kraft 36EC® + Score 250EC®. * Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle

Essa diminuição na atividade enzimática também foi observada na enzima de defesa antioxidante GR medida nas brânquias dos organismos expostos ao Score 250EC® *spray drift* e a mistura Kraft 36EC® + Score 250EC® *spray drift*. Nenhuma alteração significativa foi observada na enzima GPx. Com relação aos parâmetros de estresse oxidativo, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de HL, porém foi observado um aumento nos níveis de MDA nas brânquias dos organismos expostos ao Kraft 36EC® *spray drift*, em relação ao controle.

Além das respostas biológicas individuais de cada biomarcador foi avaliado o índice integrativo IBRv2 (*Integrated Biomarker Response version 2*) de Sanchez, Burgeot e Porcher (2013). Estes cálculos são baseados no conceito do desvio de referência. O teste IBRv2 usa resultados do controle para determinar os valores de outros grupos e o número IBR é a soma do desvio de cada parâmetro. A Figura 5 mostra o gráfico de barras com os dados de IBRv2, verificando-se que as exposições ao Kraft 36EC® *runoff*, Score 250EC® *runoff*, Kraft 36EC® *spray drift*, Score 250EC® *spray drift* e Kraft 36EC® + Score 250EC® *spray drift* foram os tratamentos que influenciaram significativamente nas alterações dos biomarcadores testados, segundo a análise de IBR (Figura 5).

Figura 4. 5 – Gráfico das diferenças significativas do IBR v2 calculados em relação ao controle

A fim de melhor observar os resultados de IBR, na Figura 6 foram construídas as *starplots* com a média do valor de cada tratamento. Esta forma de análise contribui para observar quanto o grupo tratado diferiu do controle. Assim, se verifica pelas *starplots* os efeitos dos tratamentos nos diferentes biomarcadores analisados em relação ao controle (FELÍCIO et al., 2018; SANCHEZ; BURGEOT; PORCHER, 2013). Se a linha vermelha dos tratamentos estiver fora da azul, o parâmetro analisado foi aumentado; e se a linha vermelha estiver dentro do azul, o parâmetro foi diminuído, comparado ao grupo controle.

Figura 4. 6 – *Starplots* construídas a partir da análise do IBRv2 mostrando a influência em relação ao controle das respostas de cada biomarcador nas diferentes exposições. Se a linha vermelha dos tratamentos estiver fora da azul, o parâmetro analisado foi aumentado, e se a linha vermelha estiver dentro do azul, o parâmetro foi diminuído, comparado ao grupo controle

Com relação aos efeitos gerados pela exposição ao controle *runoff* observa-se pela *starplot* que a presença do aporte de material carreado, mesmo sem contaminação, promove um sutil aumento dos biomarcadores UDPGT, GPx e MDA (Figura 6), porém como mostra a análise de IBRv2 (Figura 5) estes efeitos não são estatisticamente significativos.

Nota-se também pela análise das *starplots* da Figura 6 que nas exposições dos organismos ao Kraft 36EC® *runoff* e Score 250EC® *runoff* houve uma maior influência da enzima de biotransformação UDPGT e consequentemente aumento da influência nos níveis de MDA em relação ao controle. Diante do exposto, quando os biomarcadores são avaliados em conjunto a partir da análise de IBR, observa-se que a exposição dos organismos em mesocosmos que receberam o aporte de *runoff* contaminado com Kraft 36EC® e com Score 250EC® promove respostas enzimáticas que ativam o mecanismo de biotransformação dos organismos. Porém, a exposição dos peixes a este *runoff* contaminado em mesocosmos acaba inibindo as defesas antioxidantes deixando o organismo desprotegido ao ataque das ERO, promovendo o estresse oxidativo nos peixes expostos. Uma diminuição das defesas antioxidantes em *Danio rerio* expostos a abamectina e difenoconazol também foram

observados em estudos realizados anteriormente em laboratório (DOMINGUES et al., 2016; MU et al., 2015, 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

Diferentemente do efeito produzido pela exposição dos organismos ao *runoff* contaminado com o Kraft 36EC® e com o Score 250EC® isolados, as misturas desses dois agrotóxicos no *runoff* não influenciaram de forma significativa nos parâmetros analisados em relação ao grupo controle. De fato, foi observado em estudos anteriores que as misturas de Kraft 36EC® e Score 250EC® promovem um efeito antagônico em cladóceros *Macrothrix flabelligera* expostos por 48h a baixas concentrações dos compostos mascarando o efeito tóxico encontrado na exposição com os compostos isolados (MOREIRA et al., 2017). Este mesmo efeito antagônico promovido pela exposição às misturas de Kraft 36EC® e Score 250EC® em baixas concentrações também foi observado nos experimentos realizados com os embriões de *Danio rerio* descritos no Capítulo 2.

Com relação aos tratamentos de *spray drift*, o Kraft 36EC® foi o tratamento capaz de gerar o maior efeito metabólico em *Danio rerio* após 96h de exposição em mesocosmos. Apesar de não ter sido observada a ativação do metabolismo de biotransformação dos parâmetros analisados, a diminuição da atividade das defesas antioxidantes fez com que o ataque das ERO às membranas lipídicas ocorresse promovendo significativo estresse oxidativo nos organismos expostos. O mesmo efeito não foi observado nas exposições com o Score 250EC® nem com as misturas de *spray drift*.

De forma geral, as concentrações e diferentes condições experimentais utilizadas nos experimentos de mesocosmos em relação aos experimentos de laboratório descritos no Capítulo 3 promoveram diferenças nos padrões de resposta dos biomarcadores analisados, como pode ser observado pela Tabela 4.

Além da diferença dos tipos de tratamentos e concentrações utilizadas (Tabela 2), o tempo de exposição (48h em laboratório e 96h em mesocosmos) pode ter sido um fator importante na diminuição das respostas enzimáticas observadas. Estudos anteriores mostram que, ao passar dos dias, o metabolismo dos organismos tende a recuperar-se dos efeitos tóxicos produzidos no início da contaminação, promovendo diminuição dos biomarcadores analisados. Em Nogueira et al. (2011), por exemplo, os autores observaram uma diminuição das enzimas de biotransformação, defesas antioxidantes e parâmetros de estresse oxidativo no período de 2 a 7 dias em tilápias expostas às misturas de óleo diesel e biodiesel. O metabolismo do peixe reagiu à contaminação, e com o passar do tempo foi recuperando-se dos efeitos causados pela contaminação.

Tabela 4. 4 – Tabela comparativa dos resultados dos biomarcadores analisados em brânquias de adultos de *Danio rerio* nos experimentos realizados em laboratório, após 48h de exposição aos tratamentos; e em mesocosmos, após 96h de exposição. Um aumento da atividade enzimática ou nos níveis dos parâmetros está indicado por “↑”, a diminuição está indicada por “↓” e a ausência de efeito significativo por “-”. As informações contidas na tabela correspondem às respostas dos biomarcadores analisados individualmente.

	EROD	UDPGT	GST	CAT	GPx	GR	HL	MDA
Experimento laboratório								
Controle	-	-	-	-	-	↓	-	-
Controle solvente	-	-	-	-	-	↓	-	-
Abamectina	↑	-	-	-	-	-	-	-
Kraft 36EC®	↑	-	-	-	-	↓	-	↑
Difenoconazol	-	-	↑	-	↑	↓	-	-
Score 250EC®	-	-	↑	-	↑	↓	-	↑
Aba + Difeno	-	-	-	-	↑	↓	-	↑
Kraft 36EC® + Score 250EC®	-	-	↑	-	↑	↓	-	↑
Experimento mesocosmos								
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle <i>runoff</i> .	-	-	-	↓	-	-	-	-
Kraft 36EC® <i>runoff</i>	-	-	-	↓	-	-	-	-
Score 250EC® <i>runoff</i>	-	-	-	↓	-	-	-	-
Kraft 36EC® + Score 250EC® <i>runoff</i>	-	-	-	↓	-	-	-	-
Kraft 36EC® <i>spray drift</i>	-	-	-	↓	-	-	-	↑
Score 250EC® <i>spray drift</i>	-	-	-	↓	-	↓	-	-
Kraft 36EC® + Score 250EC® <i>spray drift</i>	-	-	-	↓	-	↓	-	-

Além das concentrações ligeiramente maiores e tempo de exposição menor, nos experimentos de laboratório a exposição dos organismos foi isolada e em condições controladas, não considerando as interações ecológicas entre comunidades e as influências das variáveis ambientais, como ocorreu neste experimento em mesocosmos (APÊNDICE C – Variáveis físico-químicas dos experimentos com adultos de *Danio rerio* – experimento mesocosmos). Alguns parâmetros como amônia, material em suspensão, turbidez e alguns nutrientes (nitrito, nitrato, fosfato e silicato) obviamente alteraram entre os tratamentos no dia da contaminação devido ao aporte de material recebido nos mesocosmos com *runoff*, e pode ter influenciado nas respostas dos biomarcadores analisados.

De fato, a partir de análises multivariadas utilizando o teste de permutações de Monte Carlo (499 permutações - $p < 0,05$), em que parâmetros físico-químicos foram adicionados, 35% da variância dos de biomarcadores é explicada pelas variáveis ambientais. A partir gráfico triplot da Figura 7 pode ser observada a separação entre os tratamentos como controle, *runoff* e *spray drift* e os parâmetros como a condutividade, nitrito, alcalinidade e temperatura parecem ter influenciado nos efeitos dos biomarcadores.

Figura 4. 7. Análise multivariada explicando 35% da variância dos biomarcadores causada pela influência das variáveis ambientais.

A partir de dados do grupo ainda não publicados, 42 tipos de algas distribuídas em 8 classes foram identificados nas amostras de mesocosmos e diferenças na densidade fitoplancônica e abundância relativa em cada um dos tratamentos dos mesocosmos foram observadas. Além disso, diferenças na comunidade de macroinvertebrados e de zooplâncton entre os tratamentos dos mesocosmos também foram observados, o que mostra a influência da contaminação nos diferentes níveis ecológicos organizacionais.

Diante do exposto, apesar dos experimentos em semicampo serem ambientalmente mais relevantes (CAQUET et al., 1996; MOREIRA et al., 2017; NOVELLI et al., 2012b), os diferentes fatores não controláveis e interações ecológicas podem mascarar ou promover outros efeitos a níveis metabólicos nos organismos não-alvo dificultando a compreensão dos mecanismos de toxicocinética dos compostos. Em contrapartida, pelo fato de utilizar concentrações maiores para que os efeitos possam ser observados e compreendidos, experimentos de laboratório geralmente superestimam os valores ambientalmente relevantes e que refletem o que realmente acontece nos ecossistemas aquáticos. Desta forma, recomenda-se sempre que possível uma avaliação conjunta utilizando as duas abordagens (laboratório e *in situ*), a fim de explorar as vantagens e a aplicabilidade das informações fornecidas em cada método.

5. Conclusão

Conclui-se que a análise dos biomarcadores propostos em peixes *Danio rerio* expostos por 96h aos diferentes tratamentos em mesocosmos promoveu poucas alterações nas atividades enzimáticas quando avaliadas isoladamente, destacando somente a inibição das enzimas antioxidantes catalase e glutathione redutase e ocorrência do estresse oxidativo nos organismos expostos ao Kraft 36EC® *spray drift*. Após análise integrada da resposta dos biomarcadores (por análise de IBR), pode-se concluir que a exposição dos organismos ao Kraft 36EC® *spray drift* em campo promove maiores efeitos deletérios no metabolismo de *Danio rerio*, seguido das exposições ao *runoff* contaminado com Kraft 36EC® e Score 250EC®. Diferenças no padrão de respostas dos biomarcadores entre os experimentos realizados em mesocosmos e em laboratório (Capítulo 3) ficam evidentes, e a realização de ambas as abordagens na análise dos efeitos de compostos tóxicos é altamente recomendada a fim de explorar as vantagens e a aplicabilidade das informações fornecidas em cada método.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.
- ALMEIDA, E. A. DE; RIBEIRO, C. A. DE O. **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems**. [s.l.] Group, Taylor & Francis, 2014. 402p.
- APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 1999. 541p.
- BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 21, n. 6, p. 1316–1322, 2002.
- BRAUN, A. et al. Ecotoxicological effects of Vertimec® 18EC on plankton. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 7, n. 2, p. 23–29, 2012.
- CAQUET, T. et al. Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 34, n. 2, p. 125–133, 1996.
- CASALI-PEREIRA, M. P. et al. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin)

to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v. 139, n. October, p. 558–564, 2015.

CHAMBERS, J. E. et al. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 8, n. 1, p. 165–176, 2002.

DAAM, M. A.; VAN DEN BRINK, P. J. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 24–37, 2010.

DOMINGUES, I. et al. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 338–345, 2010.

DOMINGUES, I. et al. Effects of ivermectin on *Danio rerio*: a multiple endpoint approach: behaviour, weight and subcellular markers. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 491–499, 2016.

ESPÍNDOLA, E. A. **Análise da percepção de risco do uso de agrotóxicos em áreas rurais: um estudo junto aos agricultores no município de Bom Repouso (MG)**. (Tese de doutorado) - Escola de Engenharia de São carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

FELÍCIO, A. A. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, n. December 2017, p. 248–256, 2018.

FRASCO, M. F.; GUILHERMINO, L. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 149–156, 2002.

GHISI, N. C. et al. Multivariate and integrative approach to analyze multiple biomarkers in ecotoxicology: A field study in Neotropical region. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 1208–1218, 2017.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. . **Methods for physicochemical analysis of freshwater**. 2. ed. Oxford: Blackwell scientific publications, 1978. 213p.

GRAVATO, C. et al. Using a multibiomarker approach and behavioural responses to assess the effects of anthracene in *Palaemon serratus*. **Aquatic Toxicology**, v. 149, p. 94–102, 2014.

KOROLEFF, F. **Determination of nutrients. IN: GRASSOHOF, K. Methods of seawater analysis.** Weinheim: Verlag. Chemie., 1976. p. 117-118.

KROON, F.; STRETEN, C.; HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–43, 2017.

LAABS, V. et al. Pesticide fate in tropical wetlands of Brazil: An aquatic microcosm study under semi-field conditions. **Chemosphere**, v. 67, n. 5, p. 975–989, 2007.

MACKERETH, S. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. . **Water analysis some revised methods for limnology. Kendal, freshwater Biol. Assoc. Sci. Publ. 36.** Wilson and Sons, 1978. 456p.

MENDES, L. B. **O uso de modelos ecossistêmicos e experimentos laboratoriais para avaliação dos efeitos do agrotóxico Mythos® (i.e. pyrimethanil) em ecossistemas aquáticos.** (Tese de Doutorado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58–66, 2017.

MU, X. et al. Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio rerio*) during different life stages. **Aquatic Toxicology**, v. 160, p. 57–68, 2015.

MU, X. et al. The developmental effect of difenoconazole on zebra fish embryos: A mechanism research. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 18–26, 2016.

NOGUEIRA, L. et al. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 97–105, 2011.

NOVELLI, A. et al. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 36–40, 2012a.

NOVELLI, A. et al. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec®18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, n. 1, p. 87–93, 2012b.

NOVELLI, A. et al. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec®18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish

juveniles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1408–1414, 2016.

NOWELL, L. H. et al. Complex mixtures of dissolved pesticides show potential aquatic toxicity in a synoptic study of Midwestern U.S. streams. **Science of the Total Environment**, v. 613–614, p. 1469–1488, 2018.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 1063–1071, 2012.

NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 14, p. 14–36, 1980.

OLIVEIRA, R. et al. Multilevel assessment of ivermectin effects using different zebra fish life stages. **Comparative Biochemistry and Physiology , Part C**, v. 187, p. 50–61, 2016.

OLIVEIRA, V. B. M.; BIANCHI, M. O.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Hazard assessment of the pesticides KRAFT 36 EC and SCORE in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9999, n. 9999, p. 1–6, 2018.

SANCHES, A. L. M. et al. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, p. 582–587, 2017.

SANCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R. V. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 577–586, 2011.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. M. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 2721–2725, 2013.

SILVA, M. R. **Gestão de embalagens de agrotóxicos - logística reversa em pequenos municípios brasileiros: o caso do município de Bom Repouso, MG.** (Dissertação de mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

STEFANI MARGARIDO, T. C. et al. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 61–67, 2013.

TEIXEIRA, C.; TUNDISI, J.; KUTNER, M. B. Plankton studies in a mangrove environment II: the standing stock and some ecological factors. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, n. 208, p. 13–41, 1965.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VANDERLEI, M. R. **Efeitos dos agrotóxicos Kraft®36EC e Score®250EC (e seus princípios ativos) em ecossistemas aquáticos: análises comparativas e ecossistêmicas**. (Dissertação de Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

VASCONCELOS, A. M. et al. Acute and chronic sensitivity, avoidance behavior and sensitive life stages of bullfrog tadpoles exposed to the biopesticide abamectin. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 500–509, 2016.

VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Environment International**, v. 28, n. 8, p. 711–717, 2003.

VIEIRA, B. H. **Efeitos do agrotóxico Vertimec® no fitoplâncton: um estudo laboratorial e “in situ”**. (Dissertação de Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados desta pesquisa concluímos que a abamectina, o difenoconazol e as respectivas formulações comerciais utilizadas (Kraft 36EC® e Score 250EC®) promovem efeitos deletérios em adultos e embriões de *Danio rerio* nas diferentes condições testadas. A partir das hipóteses apresentadas no início da tese e com os resultados obtidos pode-se afirmar que:

- Na avaliação da toxicidade dos praguicidas Kraft 36EC® (i.a. abamectina) e Score 250EC® (i.a. difenoconazol) os adultos de *Danio rerio* foram mais sensíveis quando comparados aos embriões. Desta forma, apesar de outros estudos indicarem que embriões são mais sensíveis que a fase adulta, recomenda-se cautela na escolha do estágio de vida do organismo teste;

- Os praguicidas Kraft 36EC® e Score 250EC®, bem como seus princípios ativos (abamectina e difenoconazol, respectivamente), quando em misturas, tem sua toxicidade e seus efeitos deletérios potencializados em peixes, caracterizando um efeito sinérgico;

- Os produtos comerciais dos praguicidas Kraft 36EC® e Score 250EC® produzem maiores efeitos tóxicos no metabolismo de peixes e, portanto, são mais perigosos quando comparados com os respectivos princípios ativos abamectina e difenoconazol;

- Biomarcadores são ferramentas representativas para avaliar os efeitos ambientais dos praguicidas Kraft 36EC® e Score 250EC® e de seus princípios ativos, uma vez que a exposição de peixes *Danio rerio* a esses compostos foi capaz de alterar significativamente as atividades de enzimas de biotransformação, de defesa antioxidante e de parâmetros de estresse oxidativo;

- Apesar da capacidade de retenção dos praguicidas Kraft 36EC® e Score 250EC® no solo, o que minimizaria a toxicidade dos compostos a organismos aquáticos, o efeito provocado pelas cargas de *runoff* contaminada com esses compostos e que chegam a ecossistemas aquáticos, bem como a ocorrência de *spray drift*, geram impactos negativos a organismos não alvos;

- Os experimentos *in situ* (mesocosmos) não produziram os mesmos padrões de resposta no metabolismo de peixes quando comparados com os experimentos realizados em laboratório. Considerando a importância dos experimentos de laboratório em condições controladas e a relevância ecológica e maior representatividade dos experimentos *in situ* recomenda-se, sempre que possível, a análise integrada das duas abordagens.

Efeitos tóxicos de misturas incluem aspectos da toxicocinética e da toxicodinâmica. Por isso é necessário avaliar as toxicidades intrínsecas relativas às espécies e aos compostos procurando esclarecer os mecanismos e entender os efeitos observados (LOUREIRO et al., 2010). A partir deste e de outros estudos pode-se observar que a toxicidade de inseticidas é frequentemente potencializada quando misturados com fungicidas azóis. Com isso, recomenda-se evitar o uso simultâneo destes compostos em campos agrícolas próximos (JAGER; GUDMUNDSÓTTIR; CEDERGREEN, 2014; RASMUSSEN et al., 2012).

A diferença no padrão de resposta entre as misturas de ingredientes ativos e das formulações comerciais no efeito tóxico observado pode ter sido influenciada pela ação dos diferentes aditivos “inertes” presentes no Kraft 36EC® e no Score 250EC®. A descrição e divulgação das informações sobre esses aditivos por parte dos fabricantes é fundamental e necessária, pois assim permitiria uma melhor avaliação dos efeitos tóxicos de agrotóxicos e embasaria a tomada de ações mais efetivas, como a substituição de compostos e adjuvantes por outros de menor efeito tóxico (VANDERLEI, 2015). Além disso, estudos futuros devem ser conduzidos para melhor explicar a influência desses aditivos inertes, uma vez que há uma escassez de informações sobre o efeito tóxico de misturas complexas de agrotóxicos (COX; SURGAN, 2006).

Além do potencial tóxico do Kraft 36EC® e do Score 250EC® baseado nos dados de letalidade, a análise dos biomarcadores analisados nos tecidos do peixe *Danio rerio* revelam os efeitos metabólicos deletérios destes compostos em concentrações ambientalmente relevantes. Considerando que peixes não são as espécies de maior sensibilidade presentes no compartimento aquático, em termos de medidas protetivas, deve-se ter muita cautela com o uso destes compostos, pois as consequências da exposição de espécies mais sensíveis de diferentes níveis tróficos ao Kraft 36EC® e ao Score 250EC® pode promover danos irreversíveis aos ecossistemas aquáticos.

As condições geoclimáticas de países tropicais, como o Brasil, influenciam no destino de agrotóxicos e contribuem para a intensificação do potencial tóxico dos mesmos. A alta declividade encontrada em Bom Repouso (MG) contribui significativamente para o escoamento superficial da água da chuva (*runoff*) nos solos contaminados com agrotóxicos. Com este fenômeno parte dos compostos aplicados é carregado e acaba intensificando os riscos ambientais às comunidades aquáticas. Além disso, as más práticas agrícolas (como o descarte e lavagem inadequados de embalagens) e as pulverizações (aérea ou não) próximos aos corpos hídricos influenciam significativamente na qualidade dos ecossistemas aquáticos.

Considerando os riscos ecológicos inerentes ao uso destes agrotóxicos discutidos, até o momento, apesar de autorizados para uso (ANVISA, 2018), o monitoramento da qualidade da água no Brasil realizado pelos órgãos estatais competentes não inclui em suas análises o controle e detecção de concentrações máximas da abamectina e do difenoconazol em amostras de água doce. Mesmo com os inúmeros estudos publicados mostrando os potenciais riscos destes compostos a organismos aquáticos não-alvos, há uma grande falha legislativa envolvendo a liberação e uso de agrotóxicos em geral no país, bem como o controle e monitoramento dos mesmos no ambiente.

Atualmente, 381 ingredientes ativos são autorizados no Brasil para uso na agricultura. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o Ministério do Meio Ambiente (MMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os órgãos responsáveis pela avaliação e aprovação do uso destes compostos. Agências estatais, como a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), por exemplo, são responsáveis pelo monitoramento da qualidade da água baseado pela normativa do Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA 357 de 2005 (CONAMA, 2005).

Com base nesta resolução, o monitoramento para a garantia da qualidade de águas doces deve ser realizado em função dos valores máximos permitidos de alguns parâmetros orgânicos e inorgânicos medidos na água. Porém, dentre os parâmetros e compostos previstos na resolução, apenas 28 dos 381 agrotóxicos devem ser monitorados (ALBUQUERQUE et al., 2016; CONAMA, 2005). A partir de um estudo de revisão recente sobre agrotóxicos verificou-se que 43 ingredientes ativos entre herbicidas, inseticidas e fungicidas foram quantificados em diferentes amostras de água doce coletadas pelo Brasil (ALBUQUERQUE et al., 2016). Em apenas 11% dos agrotóxicos aprovados e quantificados em águas Brasileiras foi observado risco potencial para a vida aquática em estudos com 59% destes compostos.

Avaliações de riscos ambientais e os padrões de qualidade da água baseados nas toxicidades individuais de alguns compostos não protegem adequadamente os ecossistemas aquáticos. No Brasil, não há informações disponíveis de como os padrões atuais foram estabelecidos e de como os compostos foram selecionados. O monitoramento das águas com critérios mais adequados de qualidade incluindo os agrotóxicos mais relevantes e medidas necessárias para aumentar o conhecimento sobre os perfis de exposição de organismos não alvo a agrotóxicos em corpos de água deveriam ser considerados nas avaliações de efeito e risco, uma vez que o objetivo é proteger a vida aquática no país que mais consome agrotóxicos no mundo (ALBUQUERQUE et al., 2016; ZAGATO; BERTOLETTI, 2006).

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.
- ANVISA. **Regularização de Produtos - Agrotóxicos. Monografias Autorizadas.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 18 maio. 2018.
- CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n 357. Diário Oficial**, 2005.
- COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803–1806, 2006.
- JAGER, T.; GUDMUNDSDÓTTIR, E. M.; CEDERGREEN, N. Dynamic modeling of sublethal mixture toxicity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 12, p. 7026–7033, 2014.
- LOUREIRO, S. et al. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: Comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1716–1726, 2010.
- RASMUSSEN, J. J. et al. Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders. **Aquatic Toxicology**, v. 118–119, p. 54–61, 2012.
- VANDERLEI, M. R. **Efeitos dos agrotóxicos Kraft®36EC e Score®250EC (e seus princípios ativos) em ecossistemas aquáticos: análises comparativas e ecossistêmicas.** (Dissertação de Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.
- ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.** São Carlos: Rima, 2006.472p.

APÊNDICE A – Artigo publicado referente ao Capítulo 1

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*)

Ana Letícia Madeira Sanches^{a,*}, Bruna Horvath Vieira^a, Marina Vanderlei Reghini^a,
Raquel Aparecida Moreira^b, Emanuela Cristina Freitas^a, Evaldo L.G. Espíndola^a,
Michiel A. Daam^{a,c}

^a NEEA/CRHEA/SHS, São Carlos Engineering School, University of São Paulo, Av. Trabalhador São Carlense, 400, 13.560-970 São Carlos, Brazil

^b Department of Ecology and Evolutionary Biology, Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luis, Km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

^c CENSE, Department of Environmental Sciences and Engineering, Faculty of Sciences and Technology, New University of Lisbon, Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal

HIGHLIGHTS

- LC50 values were 59 µg/L (abamectin) and 1.4 mg/L (difenoconazole).
- The pesticide mixture showed synergetic effects to zebrafish.
- Implications for pesticide risk assessment in tropical countries are discussed.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2017

Received in revised form

5 September 2017

Accepted 6 September 2017

Available online 6 September 2017

Handling Editor: David Volz

Keywords:

Pesticide mixture

Acute toxicity

Danio rerio

Tropics

ABSTRACT

Concerns have been raised in recent years on the potential risks related with pesticide mixtures that are likely to be present in agricultural edge-of-field waterbodies. Despite the high use of pesticides in tropical countries like Brazil, studies evaluating pesticide mixtures are especially scarce in the tropics. The insecticide abamectin and the fungicide difenoconazole are the main pesticides intensively used in Brazilian strawberry crop and are hence likely to occur simultaneously. The aim of the present study was therefore to evaluate the toxicity of abamectin, difenoconazole and their mixture to the tropical fish *Danio rerio*. Laboratory toxicity tests with the individual pesticides indicated 48 h-LC₅₀ values of 59 µg L⁻¹ for abamectin and 1.4 mg L⁻¹ for difenoconazole. Mixtures of the two pesticides revealed a synergistic deviation of the independent action model. Implications of study findings for the aquatic risk assessment of pesticide mixtures, especially in tropical countries and indications for future research are discussed.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Agricultural production systems in tropical countries are generally under a greater pest pressure than their temperate counterparts due to favorable environmental conditions for insect pests and weeds to proliferate (Lewis et al., 2016). Intensification of agriculture and expansion of agricultural frontiers with concomitant increases in pesticide use have therefore been evident in Latin America since the late 1990s (Carriquiriborde et al., 2014).

* Corresponding author. NEEA/CRHEA/SHS, São Carlos Engineering School, University of São Paulo, Av. Trabalhador São Carlense, 400, CEP 13.560-970 São Carlos, SP, Brazil.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.027>

0045-6535/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Brazil, for example, became the world's top pesticide market consumer in 2008, and currently accounts for approximately 20% of the total world use (Albuquerque et al., 2016). Despite this high use of pesticides in tropical countries like Brazil, there is still relatively little knowledge about the fate and toxicity of pesticides in tropical aquatic ecosystems as compared to temperate systems (Daam and Van den Brink, 2010; Carriquiriborde et al., 2014; Lewis et al., 2016). Sensitivity comparisons of tropical and temperate species to pesticides have not demonstrated a consistent greater or lesser sensitivity of tropical species as compared to their temperate counterparts, although such comparisons are based on a relatively small tropical dataset (e.g. Maltby et al., 2005; Kwok et al., 2007; Rico et al., 2011). Studies evaluating mixtures of pesticides likely to occur in tropical edge-of-field are even scarcer (Lewis et al., 2016; Moreira et al., 2017).

The main Brazilian strawberry crop area in the municipality of Bom Repouso (Minas Gerais) has a tropical climate by altitude, and can be classified as a monsoon-influenced humid subtropical climate according to the Koppen climate classification. It is an agricultural area with intensive use of pesticides and previous field studies in this area identified the insecticide/acaricide Kraft® 36 EC (a.i. abamectin) and the fungicide Score® 250 EC (a.i. difenoconazole) as the main pesticides used in this area (Nunes, 2010; Nunes and Espindola, 2012). Abamectin is an avermectin that acts on the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in both invertebrates and vertebrates (Novelli et al., 2016). Difenconazole is an azole fungicide known to act by interfering with the ergosterol biosynthesis in target fungi leading to morphological and functional changes of the fungal cell membrane (Campbell, 1989; EC, 2006a.) Since both pesticides are intensively used throughout the year, they are likely to occur simultaneously in edge-of-field water bodies in this region and this pesticide mixture may have greater toxic effects to aquatic life in these ecosystems than the individual compounds. Moreira et al. (2017), for example, noted synergistic effects of high binary mixture concentrations containing abamectin and difenoconazole to the Neotropical cladoceran *Macrothrix flabelligera*. In addition, these authors noted that water from microcosms receiving runoff water from experimental soil plots applied with the recommended doses of these individual pesticides did not produce mortality in the test organisms. Microcosms that received runoff water containing the pesticide mixture, however, did cause a short-term effect on mobility of *M. flabelligera* (Moreira et al., 2017).

The aim of the present study was to evaluate the toxicity of abamectin and difenoconazole to the zebrafish *Danio rerio*. These two compounds have already been tested on this species individually but not in mixtures. Besides that, the species chosen is widely known and used in

ecotoxicological studies and it has been recommended as a test species for tropical regions (OECD,1998; Daam and Van den Brink, 2010). Methods for laboratory cultivation and toxicity testing have previously been developed for this species (e.g. OECD, 1992; ABNT, 2011). Acute laboratory toxicity tests were conducted with the individual compounds to establish their respective toxicity thresholds. Mixtures of both compounds were also tested to test their combined effect and to evaluate its underlying mechanism.

2. Materials and methods

2.1. Test organisms and acclimatization

Adult zebrafish (*Danio rerio*) were acquired from a local commercial hatchery in São Carlos (SP, Brazil). The organisms were acclimatized and maintained in our laboratory (NEEA/CRHEA) under controlled temperature (25 ± 2 °C) and photoperiod (12 h light:12 h dark; light intensity ± 1000 lx). Fish were kept in 90-L glass aquaria containing reconstituted water prepared according to standard ABNT (2011) with pH 7.0-7.6 and hardness 40-48 mg CaCO_3/L . Water was constantly aerated (dissolved oxygen $> 6,0$ mg L^{-1}) and fish were fed ad libitum with Tetramin[®] on a daily basis until one day before the start of the test. Fish were not fed during the experiment and initial fish size (2.8 ± 0.4 cm) and weight (0.4 ± 0.1 g) were determined based on 10% of the fish in each lot used.

2.2. Toxicity tests

Acute toxicity tests (test duration: 48 h; endpoint: mortality) were conducted with technical abamectin (PESTANAL[®], Sigma Aldrich - CAS Number: 71751-41-2; purity 98,6%) and difenoconazol (PESTANAL[®], Sigma-Aldrich - CAS Number: 119446-68-3; purity 99,7%). Stock solutions of abamectin (1 mg L^{-1}) and difenoconazole (10 mg L^{-1}) were prepared by diluting the technical substances in acetone. Subsequently, these stock solutions were diluted with reconstituted water (ABNT, 2011) to obtain five test concentrations for abamectin (20, 40, 60, 80 and 100 mg L^{-1}) and difenoconazole (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 mg L^{-1}), besides an untreated control (only reconstituted water) and a solvent control (reconstituted water with 0.025% v/v acetone). The test concentrations of the two compounds were based on the results of preliminary tests (and hence expected mortality rates) of the two compounds.

Toxicity tests with the mixture of the two compounds were conducted with all 36 possible concentration combinations using a factorial design (Fig. 1), which with the solvent control totalized 37 treatments. All treatments with the individual compounds and mixtures were conducted simultaneously to avoid any influence of eventual differences in sensitivity of test

organisms used and experimental conditions. Each treatment was conducted in triplicate with each replicate consisting of a 1-L non-toxic polypropylene plastic container (PRAFESTA®) containing three fish each, in accordance with ABNT (2011) recommendations. The experimental conditions during the test were the same as those described for fish acclimatization. Physicochemical parameters [temperature, pH and dissolved oxygen (DO)] in the test water were measured at the beginning and at the end of the test. Temperature and pH were measured with a Micronal B374 potentiometer, whereas dissolved oxygen (DO) was quantified using a YSI DO meter (YSI 55-25FT). A reference test with KCl was conducted to confirm good physiological conditions of the fish.

Fig. 1. Factorial design adopted to select the test concentrations in the single and mixture toxicity tests with abamectin and difenoconazole.

2.3. Chemical analysis of the test substances

To confirm nominal test concentrations, stock solutions were analyzed with high-performance liquid chromatography (HPLC/ MS/MS Agilent® 6490 series). The chromatographic analysis conditions were: Agilent Zorbax ODS C18 column (250 mm 4.6 mm 5 mm) and temperature of 25 °C. The isocratic mobile phase utilized was acetonitrile and water (0.1% formic acid; 90:10 v/v) for 6 min, at an injection volume of 20 µL and a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. Analyses were carried out in three replicates. Based on absorbance signals observed in the Diode-Array Detection (DAD) spectrum of the standard solutions, abamectin and difenoconazole were detected and quantified at 246 nm and 230 nm with retention times of 2.9 and 2.2 min, respectively.

The precision in terms of repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD), was 2.05% for abamectin and 1.88% for difenoconazole. Detection limits were 22.2 mg L⁻¹ (abamectin) and 27.2 mg L⁻¹ (difenoconazole).

2.4. Data analysis

The 48 h-LC₅₀ values for the acute toxicity tests conducted with the single compounds were calculated based on confirmed nominal test concentrations by nonlinear regression using the three-parameter logistic curve through the software Statistica version 7 (Statsoft, 2004). Mortality data from the toxicity tests with the pesticide mixtures were analysed through the conceptual models of concentration addition (CA) and independent action (IA). Initially, the observed mortality data were compared with the combined expected effect calculated from the individual exposures using the MIXTOX tool (Jonker et al., 2005). The analysis was then extended, as described in Jonker et al. (2005) and the three deviations from the reference models synergetic/antagonistic interactions (S/A), deviation dose ratio-dependent (DR) and dose level- dependent (DL) were modelled by adding two parameters ("a" and "b"; Table 1). The parameter "a" becomes negative and positive in synergistic and antagonistic deviations, respectively. To describe the dose level-dependent (DL) deviation, another parameter (BDL) is included in addition to the parameter "a".

Table 1. Interpretation of the additional parameters ("a" and "b") that define the functional form of the standard deviations from the independent action model (IA); adapted from Jonker et al. (2005).

Standard Deviation	Parameter "a"	Parameter "b"
Synergism/antagonism (S/A)	a > 0 - antagonism a < 0 - synergism	
Dose ratio-dependent (DR)	a > 0 - antagonism, except for those proportions of mixtures where a value of significant negative b indicates synergism	b _i > 0 - antagonism where the toxicity of the mixture is mainly caused by the toxic agent <i>i</i>
	a < 0 - synergism, except for those proportions of mixtures where a significant positive value of b indicates antagonism	b _i < 0 - synergy where the toxicity of the mixture is mainly caused by toxic <i>i</i>
Dose level-dependent (DL)	a > 0 - low dose level antagonism and synergy in high dose level	b _{DL} > 2 - change in level of dose lower than EC ₅₀
		b _{DL} = 2 - change in EC ₅₀
	a < 0 - low dose level synergism and antagonism in high dose level	1 < b _{DL} < 2 - change in level of dose greater than EC ₅₀
		b _{DL} < 1 - no change, but the magnitude of S/A is dependent on the level of effect

In the latter case, the value of “a” indicates the deviation in high and low doses and the value of BDL indicates at what dose level the deviation changes. Further details on the deviation functions can be obtained from Jonker et al. (2005). The data were verified for these conceptual models and deviations, and the best fit was chosen through the maximum likelihood method. After identifying the statistically most appropriate model for the description of the deviation, the pattern of toxicity was deduced directly from the parameter values (Table 1) and the maximum deviation could be calculated in terms of effect level (Jonker et al., 2005; Freitas et al., 2014).

3. Results and discussion

3.1. Test performance

Physical-chemical water conditions were overall stable during the experimental period of the tests and also comparable between the different treatments: Water temperature = 24 ± 0.4 °C; pH = 7.6 ± 0.2 (0 h) and 7.2 ± 0.3 (48 h); DO = 7.2 ± 0.2 mg L⁻¹ (0 h) and 5.4 ± 0.6 mg L⁻¹ (48 h). Although DO slightly decreased throughout the experimental period, it remained within the reference level as set in (>5.0 mg L⁻¹). The reference test conducted with KCl revealed an LC₅₀ of 1.0 ± 0.2 mg/L (mean $\pm$ SD; range 0.7-1.4 mg/L) and as such fulfilled the acceptance criteria set in ABNT (2011).

3.2. Single compound toxicity

The LC₅₀ values obtained for the individual compounds were in agreement with those reported in the literature for *D. rerio* exposed to these compounds. For abamectin, the 48 h-LC₅₀ value of 59 mg L⁻¹ (95% C.I.: 54-63 mg L⁻¹) calculated in the present study is comparable to that previously established in our laboratory (33 mg L⁻¹ Novelli et al., 2012). The 48 h-LC₅₀ obtained for difenoconazole in the present study was 1.41 mg L⁻¹ (95% C.I.: 1.40-1.43 mg L⁻¹) so it was approximately 24 times less toxic to the fish than abamectin. The 96 h-LC₅₀ reported by Mu et al. (2013; 1.45 mg L⁻¹) is the same as the one we report here, despite the longer exposure used by those authors.

3.3. Mixture toxicity

Pesticide mixtures with similar modes of action are generally considered to act through concentration addition, whereas the independent action (IA) model is used with mixtures of pesticides with different modes of action (e.g. Jonker et al., 2005; Loureiro et al., 2010;

Altenburger et al., 2013; Silva et al., 2015). Subsequently, the IA model was applied in the present study to evaluate the response of *D. rerio* exposed to mixtures of abamectin and difenoconazole, and deviations from this model were evaluated using the methodology developed by (Jonker et al., 2005; Table 1). As anticipated, the derived mixture toxicity data indeed fitted the IA model, producing a sum of the squares of the residuals (SS) of 71.92 ($p < 0.05$; $r^2 = 0.29$; Table 2).

Table 2. Summary of the analysis of the acute toxicity tests evaluating mixtures of abamectin and difenoconazole to *Danio rerio*.

	IA	S/A	DR	DL
max	0,98	0,98	0,98	0,98
$\beta_{\text{Abamectin}}$	2,68	3,70	0,98	9,39
$\beta_{\text{Difenoconazole}}$	9,11	9,15	9,39	11,96
LC ₅₀ to Abamec	0,03	0,03	11,96	0,06
LC ₅₀ to Difeno	1,05	1,11	0,06	1,23
a	-	-13,37	1,24	-9,00
b _{DR/DL}	-	-	-12,42	0,19
SS	71,92	47,90	45,68	46,42
r^2	0,29	0,53	0,55	0,54
χ^2 or test F	29,75	24,02	2,22	1,48
df	-	1	1	1
$p (\chi^2 / F)$	$5,5 \times 10^{-6}$	$9,5 \times 10^{-7}$	0,14	0,22

max = maximum value of the response; β = slope the individual response dose curve; LC₅₀ = median effective concentration; a, b_{DR} e b_{DL} = s function parameters; SS = sum of the squares of the residuals; r^2 = regression coefficient; Test χ^2 or F = statistical test; df = degree of freedom; $p (\chi^2 / F)$ = level of significance for the statistical test. IA = independent action model, S/A = deviation synergism/antagonism, DR = dose ratio-dependent deviation and DL = dose level dependent deviation.

The results of the toxicity tests are visualised in Figs. 2 and 3. The concave lines in the isobologram (Fig. 2) clearly indicate a synergistic effect of the two compounds on *D. rerio*. When the modelled LC_x and obtained LC_x are plotted against one another (Fig. 3), a synergistic interaction between the pesticide mixture and the test species is apparent. These visual observations are also confirmed with the analysis of deviations from the IA model following the method of (Jonker et al., 2005; Table 2). After the addition of the parameters “a” and “b” to the IA model, the synergistic deviation of the IA model was indeed noted to best describe the data, as can be deduced from the decrease in the SS value to 47.90 and the obtained correlation coefficient ($p < 0.05$; $r^2 = 0.53$; Table 2). The toxic effects of mixtures

include both toxicokinetic and toxicodynamic aspects and it is therefore necessary to evaluate the underlying species- and compound-related toxicity and clearance mechanisms to understand the synergistic effects as observed in the present study (Loureiro et al., 2010).

Unlike in mammals, abamectin can cross the blood-brain barrier in fish and cause toxicity (Høy et al., 1990). Abamectin is known to act on the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in both invertebrates and vertebrates, and also on glutamatergic receptors in the chloride channels of invertebrates (Novelli et al., 2016). After abamectin exposure, the increase in chloride ions hyperpolarizes the nerve and muscle cells, ultimately interfering with neuromuscular transmission, leading to death (Campbell, 1989).

Difenoconazole is a triazole fungicide that is known to act by interfering with the ergosterol biosynthesis in fungi by inhibition of the C-14-demethylation of sterols, which leads to morphological and functional changes of the fungal cell membrane (EC, 2006a). Interestingly, it has been discussed that there is no indication that toxic effects of difenoconazole in fish result from a specific mode of action other than general or systemic toxicity (EC, 2006a).

Fig. 2. Isobologram of the interactive effects of the pesticide mixtures on *Danio rerio* survival, demonstrating a synergism deviation from the independent action (IA) model that was analysed. Linear, concave (numbers within the isoboles < 1) and convex (numbers within the isoboles > 1) isoboles in isobolograms represent no interaction, synergy and antagonism, respectively (Ryall and Tan, 2015).

Fig. 3. Modelled versus obtained LC_x values, demonstrating a synergistic interaction between the pesticide mixture and *Danio rerio*.

After reviewing mixture toxicity studies, Cedergreen (2014) concluded that synergistic interactions involving azole fungicides are most likely all examples of cases where the metabolism of the pesticides is inhibited by the azole. Azole fungicides are known inhibitors of a wide range of P450 monooxygenases, which are enzymes responsible for the phase I metabolism of lipophilic compounds, together with a range of biosynthesis processes in both plants and animals (Guengerich, 2008; Walker, 2009). Hence, the toxicity of insecticides is often severely enhanced when mixed with azole fungicides (Rasmussen et al., 2012; Cedergreen, 2014), as was observed in the present study.

3.4. Implications for risk assessment and concluding remarks

Studies in Brazil and elsewhere have reported the simultaneous use of formulated products containing difenoconazole and abamectin in agricultural areas near adjacent water bodies (e.g. Milhome et al., 2009; Nunes, 2010; Thuy et al., 2012). Azole fungicides and pyrethroid insecticides are also often applied in tank mixtures to agricultural fields (Rasmussen et al., 2012). Various studies have proven that azole fungicides synergise the effect of insecticides, although such studies appear to be limited to invertebrates and primary producers (c.f. Rasmussen et al., 2012; Cedergreen, 2014). For example, Moreira et al. (2017) previously demonstrated the synergetic effects of higher mixture concentrations of abamectin and difenoconazole on the cladoceran *Macrothrix flabelligera*. To the best of our knowledge,

however, there are no other studies that have demonstrated synergetic effects of binary mixtures containing azole fungicide and insecticide on fish.

This study demonstrated that mixtures of the two selected pesticides caused greater toxicity (synergism) to the fish *D. rerio* than when tested individually. Prospective environmental risk assessments and environmental quality standards (EQS) based on individual exposures may hence not adequately protect aquatic ecosystems. In practice, however, this will only be the case if predicted or measured environmental concentrations (PEC and MEC, respectively) may be expected to exert non-acceptable risks. For example, in the European prospective risk assessment of abamectin and difenoconazole, the worst-case tier-4 PECs are 0.43 mg L⁻¹ and 0.44 mg L⁻¹, respectively (EC, 2006a, 2006b). These PECs are slightly below the acute regulatory acceptable concentration (RAC) for abamectin (0.66 mg L⁻¹) but well below the RAC for difenoconazole (6.5 mg L⁻¹) (EC, 2006a, 2006b). From an effect assessment perspective, the procedure used with individual compounds would not be protective if effects for mixtures containing pesticide concentrations at their respective RAC levels would exert unacceptable effects. From a risk assessment perspective, if mixtures at exposure levels corresponding to their PEC or MEC exert unacceptable risks, the procedure based on individual compounds would not be protective. Subsequently, although several studies have noted synergistic effects (e.g. as reviewed by Cedergreen, 2014), this does not necessarily mean that risk assessments based on individual compounds are not protective. In the present study, for example, the lowest test concentrations (20 mg L⁻¹ and 500 mg L⁻¹ for abamectin and difenoconazole, respectively) were well above both PECs and RACs indicated above. Future studies including treatments with concentrations considered protective (RAC, EQS) and those equalling predicted (PEC) or measured (MEC) levels would enable evaluating to what extent mixture toxicity needs to be included in effect and risk assessments. At such low test concentrations, these future studies should also include sublethal endpoints.

The RAC and PEC values above were derived for a European ERA and could have little applicability for tropical countries like Brazil. Sensitivity comparisons between temperate and tropical species (e.g. Maltby et al., 2005; Kwok et al., 2007; Rico et al., 2011) and communities (e.g. Daam and Van den Brink, 2011 and references therein) have not demonstrated consistent differences. Subsequently, toxicity data and RACs based on taxa from both climatic regions may also be expected not to differ in a significant, or at least consistent, matter. Peak exposures of edge-of-field water bodies to pesticides, however, may be expected to be greater in tropical than in temperate agroecosystems due to higher expected levels of runoff and spray drift as well as more intensive pesticide use in the tropics (Moreira

et al., 2017). On the other hand, dissipation of pesticides may be expected to be faster under warm tropical conditions (e.g. Sanchez-Bayo and Hyne, 2011). Subsequently, PEC and MEC values may be expected to differ to a significant extent between the climatic regions. Field studies in tropical farms measuring pesticide concentrations and environmental parameters are needed to increase our knowledge on pesticide exposure profiles in tropical edge-of-field waterbodies. Besides providing MECs, such studies would also aid in developing and calibrating pesticide fate simulation models that enable determining PECs. Semi-field experiments may also aid in underpinning the importance of different pesticide entry routes under a more controlled experimental settings. For example, in previous studies we treated aquatic microcosms by direct overspray and with runoff from an experimental agricultural field to evaluate the differential toxic effects caused through these exposure routes (Novelli et al., 2016; Moreira et al., 2017). In that way, Moreira et al. (2017) demonstrated that microcosms receiving runoff water only showed toxicity to the cladoceran tested (*Macrothrix flabelligera*) when obtained from the experimental plots that were treated with both pesticides. In addition, the microcosms that were treated by direct overspray of both pesticide formulations showed the most pronounced toxic effects (Moreira et al., 2017).

Although there has been a great increase in research on mixture toxicity over the past few years, several other authors have also concluded that additional information is required to develop practical criteria for selecting pesticide mixtures that require additional (Legislative) attention based on their likelihood to exert synergistic responses at concentrations likely to occur in the field (e.g. Altenburger et al., 2013; Coors et al., 2013; Silva et al., 2015). Toxicokinetic-toxicodynamic (TKTD) models are increasingly used in the analysis of toxicity data for single-chemical exposure (e.g. EFSA, 2013). However, models of this type are also absolutely essential for a more mechanistic understanding of mixture ecotoxicology (Jager et al., 2014).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank the São Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP) for their financial support (Process number: 2014/14621-0). This work was also supported by the Brazilian government through the Special Visiting Researcher

program (MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs reference 402392/2013-2) and the Portuguese government (FCT) through a postdoc grant for the last author (SFRH/BPD/109199/ 2015) and the research unit UID/AMB/04085/2013 (CENSE). The authors are also indebted to Luiz Valdemar Tornisielo and Rodrigo Pimpinato (Ecotoxicology Laboratory, Center for Nuclear Energy in Agriculture (CENA/ESALQ/USP, Piracicaba, SP) for chemical pesticide analysis.

References

- [ABNT] Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011. Ecotoxicologia Aquática e Toxicidade Aguda - Método de Ensaio com peixes. NBR 15088, Rio de Janeiro, Brasil.
- Albuquerque, A.F., Ribeiro, J.S., Kummrow, F., Nogueira, A.J.A., Montagner, C.C., Umbuzeiro, G.A., 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environ. Sci. Process. Impacts* 18, 779-787.
- Altenburger, R., Arrhenius, A., Backhaus, T., Coors, A., Faust, M., Zitzkat, D., 2013. Ecotoxicological Combined Effects from Chemical Mixtures Part 1: Relevance and Adequate Consideration in Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products and Biocides. report No. UBA-FB 00. Umweltbundesamt (UBA), Dessau-Roßlau, Germany.
- Campbell, W.C., 1989. Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag, New York.
- Carriquiriborde, P., Mirabella, P., Waichman, A., Solomon, K., Van den Brink, P.J., Maund, S., 2014. Aquatic risk assessment of pesticides in Latin America. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10, 539-542.
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One* 9, e96580.
- Coors, A., Löffler, I., Noronha-Jansch, P., Weisbrod, B., Schoknecht, U., Sacher, F., 2013. Ecotoxicological Combined Effects from Chemical Mixtures Part 2: Development of Ecotoxicological Tests with Biocidal Products and Eluates: Investigating the Suitability of Biotests with Algae and Daphnids to Estimate Mixture Toxicity. report No. UBA-FB 00. Umweltbundesamt (UBA), Dessau-Roßlau, Germany.
- Daam, M.A., Van den Brink, P.J., 2010. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. *Ecotoxicology* 19, 24-37.
- Daam, M.A., Van den Brink, P.J., 2011. Conducting model ecosystem studies in tropical climate zones: lessons learned from Thailand and way forward. *Environ. Pollut.* 159, 940-946.

- [EC] European Commission, 2006a. Draft Assessment Report (DAR) e Public Version e Initial Risk Assessment provided by the Rapporteur Member State Sweden for the Existing Active Substance Difenconazole of the Third Stage (Part A) of the Review Programme Referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC.
- [EC] European Commission, 2006b. Draft Assessment Report (DAR) e Public Version e Initial Risk Assessment provided by the Rapporteur Member State the Netherlands for the Existing Active Substance Abamectin of the Third Stage (Part A) of the Review Programme Referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC.
- [EFSA] European Food Safety Authority, 2013. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in the edge-of-field surface waters. EFSA J. 11, 3290.
- Freitas, E.C., Pinheiro, C., Rocha, O., Loureiro, S., 2014. Can mixtures of cyanotoxins represent a risk to the zooplankton? The case study of *Daphnia magna* Straus exposed to hepatotoxic and neurotoxic cyanobacterial extracts. Harmful Algae 31, 143-152.
- Guengerich, F.P., 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. Chem. Res. Toxicol. 21, 70-83.
- Høy, T., Horsberg, T.E., Nafstad, I., 1990. The disposition of ivermectin in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Pharmacol. Toxicol. 67, 307-312.
- Jager, T., Gudmundsdottir, E.M., Cedergreen, N., 2014. Dynamic modeling of sublethal mixture toxicity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Environ. Sci. Technol. 48, 7026-7033.
- 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. Environ. Toxicol. Chem. 24, 2701-2713.
- Kwok, K.W., Leung, K.M., Lui, G.S., Chu, V.K., Lam, P.K., Morritt, D., Crane, M., 2007. Comparison of tropical and temperate freshwater animal species' acute sensitivities to chemicals: implications for deriving safe extrapolation factors. Integr. Environ. Assess. Manag. 3, 49-67.
- Lewis, S.E., Silburn, D.M., Kookana, R.S., Shaw, M., 2016. Pesticide behavior, fate, and effects in the tropics: an overview of the current state of knowledge. J. Agric. Food Chem. 64, 3917-3924.

- Loureiro, S., Svendsen, C., Ferreira, A.L.G., Pinheiro, C., Ribeiro, F., Soares, A.M.V.M., 2010. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1716-1726.
- Maltby, L., Blake, N., Brock, T.C.M., Van den Brink, P.J., 2005. Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 379-388.
- Milhorne, M.A.L., Sousa, D.O.B., Lima, F.A.F., Nascimento, R.F., 2009. Assessment of surface and groundwater potential contamination by agricultural pesticides applied in the region of Baixo Jaguaribe CE, Brazil. *Eng. Sanit. Ambient.* 14, 363-372.
- Moreira, R.A., Daam, M.A., Vieira, B.H., Sanches, A.L.M., Reghini, M.V., Mansano, A.S., Freitas, E.C., Espindola, E.L.G., Rocha, O., 2017. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. *Aquat. Toxicol.* 185, 58-66.
- Mu, X., Pang, S., Sun, X., Gao, J., Chen, J., Chen, X., Li, X., Wang, C., 2013. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environ. Pollut.* 175, 147-157.
- Novelli, A., Vieira, B.H., Cordeiro, D., Cappelini, L.T.D., Vieira, E.M., Espindola, E.L.G., 2012. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere* 86, 36-40.
- Novelli, A., Vieira, B.H., Braun, A.S., Mendes, L.B., Daam, M.A., Espíndola, E.L.G., 2016. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. *Chemosphere* 144, 1408-1414.
- Nunes, M.E.T., 2010. Assessment of Pesticides Effects on Soil Fauna through Ecotoxicological Tests with *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) and Natural Soil Fauna Community. Doctoral thesis. University of São Paulo.
- Nunes, M.E.T., Espindola, E.L.G., 2012. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology* 21, 1063-1071.
- [OECD] Organization for Economic Cooperation and Development, 1992. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No 203: Fish Acute Toxicity Test.
- [OECD] Organization for Economic Cooperation and Development, 1998. OECD Series on Testing and Assessment. Part 1: Report. In: Number 11. Detailed Review Paper on Aquatic Testing Methods for Pesticides and Industrial Chemicals.

- Rasmussen, J.J., Monberg, R.J., Baattrup-Pedersen, A., Cedergreen, N., WibergLarsen, P., Strobel, B., Kronvang, B., 2012. Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders. *Aquat. Toxicol.* 118e119, 54-61.
- Rico, A., Waichman, A.V., Geber-Correa, R., Van den Brink, P.J., 2011. Effects of malathion and carbendazim on Amazonian freshwater organisms: comparison of tropical and temperate species sensitivity distributions. *Ecotoxicology* 20, 625-634.
- Ryall, K.A., Tan, A., 2015. Systems biology approaches for advancing the discovery of effective drug combinations. *J. Cheminform* 7, 1-15.
- Sanchez-Bayo, F., Hyne, R.V., 2011. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 577-586.
- Silva, E., Daam, M.A., Cerejeira, M.J., 2015. Predicting the aquatic risk of realistic pesticide mixtures to species assemblages in Portuguese river basins. *J. Environ. Sci.* 31, 12-20.
- Statsoft, 2004. Statistica Version 07. Freely accessible via. www.statsoft.com.
- Thuy, T.T., Van Geluwe, S., Nguyen, V.A., Van der Bruggen, B., 2012. Current pesticide practices and environmental issues in Vietnam: management challenges for sustainable use of pesticides for tropical crops in (South-East) Asia to avoid environmental pollution. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 14, 379-387.
- Walker, C.H., 2009. Factors determining the toxicity of organic pollutants to animals and plants. In: *Organic Pollutants*. CRC Press, London, pp. 17-66.

APÊNDICE B – Artigo publicado referente ao Capítulo 2

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Lethal and sublethal toxicity of abamectin and difenoconazole (individually and in mixture) to early life stages of zebrafish

Ana Leticia Madeira Sanches ^{a,*}, Michiel Adriaan Daam ^b, Emanuela Cristina Freitas ^a, Aline Andrade Godoy ^c, Gabriela Meireles ^d, Ana Rita Almeida ^e, Inês Domingues ^e, Evaldo Luiz Gaeta Espíndola ^a

^a NEEA/CRHEA/SHS, São Carlos Engineering School, University of São Paulo, Av. Trabalhador São Carlense, 400, 13.560-970 São Carlos, Brazil

^b CENSE, Department of Environmental Sciences and Engineering, Faculty of Sciences and Technology, New University of Lisbon, Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal

^c Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^d School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^e Department of Biology and CESAM, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

HIGHLIGHTS

- The order of zebrafish life stage sensitivity was juvenile > adult > embryo.
- The mixture revealed antagonism at low dose levels and synergism at high dose levels.
- Sublethal parameters (related with locomotion) are more sensitive than lethality.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2018

Received in revised form

4 July 2018

Accepted 5 July 2018

Available online 11 July 2018

Handling Editor: David Volz

Keywords:

Early life stages

Abamectin

Difenoconazole

Pesticide mixture

Zebrafish

ABSTRACT

In recent years, the need for the development of alternative test methods for the conventional acute fish toxicity test (AFT) with adult fish has often been discussed. In addition, concerns have been raised on the potential risks related with environmentally realistic pesticide mixtures since risk evaluations have traditionally been based on individual pesticides. The insecticide/acaricide abamectin and the fungicide difenoconazole are the main pesticides that are intensively used in Brazilian strawberry crop and are hence likely to occur simultaneously in edge-of-field waterbodies. The aim of the present study was therefore to evaluate the lethal and sublethal toxicity of single and mixture exposures of these pesticides to zebrafish early life stages (embryos and juveniles). By comparing the derived toxicity data of the individual compounds with that previously determined for zebrafish adults, the order of life stage sensitivity was juvenile > adult > embryo. The pesticide mixture revealed a dose-level dependent deviation of the independent action model, with antagonism at low dose levels and synergism at high dose levels. Sublethal parameters (especially those related with locomotion) were considerably more sensitive than lethality. Subsequently, the inclusion of sublethal parameters may greatly improve the sensitivity of FET tests and hence its suitability as a substitution of adult fish testing in risk assessment evaluations.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Agricultural production systems in tropical countries have greatly increased their use of pesticides and fertilizers over the past decades (Sanchez-Bayo and Hyne, 2011; Lewis et al., 2016). Brazil, for example, became the world's top pesticide market consumer in 2008, accounting for approximately 20% of the total world use (Albuquerque et al., 2016). However, there is still relatively little knowledge about the fate and toxicity of pesticides in tropical aquatic ecosystems as compared to temperate systems (Daam and Van den Brink, 2010; Sanchez-Bayo and Hyne, 2011; Carriquiriborde et al., 2014; Lewis et al., 2016). Studies evaluating pesticide mixtures likely to occur in tropical edge-of-field are even scarcer

(Lewis et al., 2016; Moreira et al., 2017; Sanches et al., 2017; Rocha et al., 2018). In a previous study, we evaluated the single and mixture toxicity of the insecticide/acaricide abamectin and the fungicide difenoconazole to adults of the tropical fish *Danio rerio* (zebrafish). These pesticides are intensively used throughout the year in strawberry crop areas and are hence likely to be present simultaneously in edge-of-field water bodies of such areas (Nunes, 2010; Nunes and Espindola, 2012; Moreira et al., 2017). Mixtures of these two pesticides revealed to have a synergistic toxic interaction on adult zebrafish, indicating that environmental risk evaluations based on individual compounds may not adequately protect aquatic ecosystems from these mixtures (Sanches et al., 2017). In recent years, the development of alternative test methods for the conventional acute fish toxicity test (AFT) with adult fish have been promoted to comply with the 3 Rs principle (replacement, reduction and refinement; Russell and Burch, 1959) for animal experimentation. The fish embryo test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) is generally considered as a promising alternative and a test guideline has been developed and validated (OECD, 2013; ECHA/UBA, 2017). Sensitivity comparison evaluations between FET and AFT toxicity data have generally demonstrated that the FET and AFT relationships are highly correlated, supporting FET as a replacement of AFT (Dang et al., 2017 and references therein). Although the FET test has been often conducted to evaluate single compound toxicity, Sobanska et al. (2018) recently indicated that multi-constituent substances and mixtures have never been tested with the FET test so far. Mu et al. (2013) indicated that despite the clear advantages of the FET test, there are still several factors that can potentially contribute to the embryonic tests not being predictive of the results of the acute toxicity of fish. On one hand, the chorion may act as a barrier to chemical exposure for some chemicals, which may result in a toxicity reduction; on the other hand, embryos may not have the fully developed metabolic pathways like adults, making embryos less sensitive to test compounds than adults (Embry et al., 2010). Previous research has indeed demonstrated that toxic substances may have a different gene expression interference (Zucchi et al., 2011), lethal effect and biomarkers response (Domingues et al., 2010) on zebrafish under different life stages. Therefore, in order to understand the effect more integrally and systematically, the chemical toxicity to zebrafish over multiple life stages should be assessed (Mu et al., 2013). The aim of the present study was to evaluate the predictive power of early life stage tests in assessing the toxicity of abamectin and difenoconazole as compared to the AFT. To this end, laboratory bioassays were conducted with zebrafish embryos and juveniles evaluating both single and mixture exposure to these

pesticides. Toxic effects and endpoints were subsequently compared with those denoted in previous studies with adult zebrafish.

2. Materials and methods

2.1. Test organisms

Zebrafish embryos for the tests were obtained from an in-house culture at the laboratories of the Department of Biology, University of Aveiro (Portugal). In this culture facility, adult zebrafish are kept in a ZebTEC (Tecniplast) recirculating water system. Culture water in this test system is tap water purified by reverse osmosis and activated carbon filtering, complemented with salt “Instant Ocean Synthetic Sea Salt” (Spectrum Brands, USA) and automatically adjusted for pH (7.5 ± 0.5) and conductivity (750 ± 50 mS). Other culture conditions are: temperature = 26 ± 1 °C; salinity = 0.35 ppt; dissolved oxygen = 95% saturation, and a photoperiod of 18 h light - 8 h dark. Nitrate, nitrite and ammonia are regularly monitored to maintain their concentrations always below 0.1 mg/L (nitrate) and 0.01 mg/L (nitrite and ammonia). Adult fish are fed twice a day with a commercially available artificial diet (ZM-400 fish food; Zebrafish Management Ltd). Zebrafish eggs were obtained by breeding of sexually mature and healthy fish in aquaria with marbles on the bottom to protect eggs from predation by adult fish. The eggs were collected, rinsed in autoclaved osmotic water, and checked under a stereomicroscope (Stereoscopic Zoom Microscope-SMZ 1500, Nikon) to discard eggs with cleavage irregularities, injuries, or other kind of malformations. Healthy fertilized eggs in a cleavage period until blastula stage (4e64 cells) were selected for the experiments.

2.2. Fish embryo toxicity (FET) tests

The FET tests followed the method as described in OECD (2013). To this end, embryos obtained as described above were exposed for 96 h in 24-well microplates under static conditions. In the tests with the individual compounds, five test concentrations were evaluated for the insecticide/acaricide Kraft 36 EC[®] (36 g abamectin/L; Cheminova, Brazil) and Score 250 EC[®] (250 g difenoconazole/L; Syngenta Crop Protection Ltda, Brazil), besides an untreated control (culture water). The test concentrations based on preliminary testing (Sanches et al., 2017) were the same for each separate compound: 0.5, 1.1, 2.4, 5.3 and 11.7 mg a.s./L. Each treatment consisted of one microplate in which twenty eggs were placed individually in a well containing 2 mL test solution. Embryos were observed daily

under a stereoscope for the following parameters: mortality, egg coagulation, somite formation, heart rate and detachment of the tail bud from the yolk sac, hatching delay and formation of oedemas. Based on the results from the tests with the individual compounds, the test concentrations in the subsequent mixture toxicity tests were set at 0.5, 1.1, 2.4, 5.3 and 11.7 mg abamectin/L (applied as Kraft 36 EC®) and 0.2, 0.5, 1.0, 2.3 and 5.0 mg difenoconazole/L (applied as Score 250 EC®). The binary mixture treatments were set through a factorial design, including all combinations of these test concentrations (n = 35) plus an untreated control. Three petri dishes (diameter: 5 cm) were used per treatment, each containing 15 mL test solution and five eggs. Given the great number of petri dishes, the eggs were only visually observed daily for egg coagulation and mortality. Coagulated and dead eggs were subsequently removed to avoid fungus formation. Besides egg coagulation and mortality after 24, 48, 72 and 96 h, egg hatching was also annotated 72, 96 and 120 h after the start of the mixture toxicity experiment.

2.3. Locomotor activity

The locomotor activity of free-swimming larvae after 120 h single exposures to sublethal concentrations of the test compounds was evaluated with the ZebraBox equipment (ViewPoint Life Science, Lyon, France). The test concentrations as set based on preliminary testing were 1.7, 3.7, 8.3, 18.1 and 40 mg abamectin/L (applied as Kraft 36 EC®) and 47, 103, 227, 500 and 1100 mg difenoconazole/L (applied as Score 250 EC®). To this end, eggs obtained as described in section 2.1 were transferred to 96-well plates, with one egg per well containing 250 μ L test solution and twenty wells per treatment. After 120 h, larval locomotion was tracked in the ZebraBox equipment in four alternating 5-min cycles of light and dark. During this in total 20 min tracking period, the swimming activity (as distance travelled in mm) was measured in 60 s intervals.

2.4. Chemical analysis of the test substances

The stock solutions used to prepare the different pesticide treatments were chemically analyzed to confirm nominal test concentrations. Concentrations of abamectin and difenoconazole were measured through LC/MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) and ID-LC/MS/MS (isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry), respectively. Chemical analyses were conducted by an external laboratory following standard guidelines in accordance with DIN EN ISO/IEC 17025:2005. Detection

limits were 0.1 mg/L for abamectin and 5 ng/ L for difenoconazole with analytical recoveries of 116% and 115%, respectively.

2.5. Data analysis

The data from the FET experiments evaluating single compounds were statistically analyzed by considering each well as an independent replicate. The percentages of embryos that showed an effect on the lethal (egg coagulation, somite formation, heartbeat and detachment of the tail bud from the yolk sac) and sublethal (hatching delay and formation of oedemas) parameters were used to calculate LC50 and EC50 values, respectively, by lognormal regression on the data. The data from the locomotor activity test were first analyzed for normality and homogeneity (Shapiro-Wilk and Levene tests). For parametric data, the one-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by the Tukey post hoc test. For non-parametric data, the Kruskal-Wallis test was conducted. All these statistical analyses were conducted with the Statistica 7.0 software at a significance level of 0.05. The data from the mixture toxicity tests were analyzed using the MIXTOX tool (Jonker et al., 2005) to evaluate the underlying conceptual model (CA: concentration addition; IA: independent action) and eventual deviations from these models (S/A: synergistic/antagonistic; DR: dose-ratio dependent; DL: dose-level dependent). For information on the data interpretation of this model, the reader is referred to Sanches et al. (2017) and Jonker et al. (2005) for a detailed description and rationale.

3. Results and discussion

3.1. Toxicity of embryos to individual compounds

No embryo mortality or effect on any of the other parameters were noted in the control treatment. In addition, abamectin and difenoconazole did not exert toxic effects on egg coagulation, somite formation, and detachment of the tail at any of the concentrations tested. The toxicity values derived for the other test parameters are provided in Table 1, together with selected published toxicity values to allow comparison. In addition, the observed effects are visualized with photos in Fig.1. Exposure to the highest abamectin concentration during 96 h resulted in an embryo mortality of 30%, hampering the calculation of an LC50 value. The test was therefore extended with an additional day and the resulting 120 h-LC50 was 3.83 (95% CI: 2.77 - 4.88) mg abamectin/L. Interestingly, a comparable 96 h-LC50 (3.58 mg/L; 95% CI: 3.44 - 3.72) was derived for difenoconazole, despite the differences in pesticide type and

mode of action (Table 2). Abamectin is an insecticide/acaricide known to act on the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors, and the resulting increase in chloride ions hyperpolarizes the nerve and muscle cells, ultimately interfering with neuromuscular transmission, leading to death (Campbell, 1989; Novelli et al., 2012). GABA receptor channels are mostly found in the central nervous system but, unlike in mammals, abamectin can cross the blood-brain barrier in fish and cause toxicity (Høy et al., 1990; Katharios et al., 2004). This mode of action may explain why heart rate was affected in all but the lowest abamectin concentration (NOEC = 0.5 mg/L; Fig. 2). Difenoconazole, on the other hand, is a triazole fungicide that is known to act by interfering with the ergosterol biosynthesis in fungi by inhibition of the C-14-demethylation of sterols, which leads to morphological and functional changes of the fungal cell membrane (EC, 2006a). The oedema formation as noted in embryos treated with higher difenoconazole concentrations (96 h-EC50 = 2.21 mg/L; 95% CI: 2.11 - 2.31; Fig. 2) may hence be related with this, although there appears to be no indication that toxic effects of difenoconazole in fish result from a specific mode of action other than general or systemic toxicity (EC, 2006a). Exposure to Kraft 36 EC[®] delayed the hatching of all embryos at all the concentrations tested (96 h-EC50 < 0.5 mg abamectin/L; Table 1). For Score 250 EC[®], however, only the higher concentrations caused hatching delays (96 h-EC50 = 2.21 mg difenoconazole/ L; Table 2). The chorion, i.e. the outermost fetal membrane around an embryo, has often been discussed to potentially act as a barrier for chemical entry (Lammer et al., 2009; Mu et al., 2013; Raftery et al., 2014). Especially highly lipophilic and/or high molecular weight substances (~3000 g/mole and greater) might not have access to the embryo due to this protective role of the chorion (Braunbeck et al., 2015; Pelka et al., 2017). However, given the physical-chemical properties of abamectin (M = 873 g/mole; Kow = 4.4; EC, 2006b) and difenoconazole (M = 406 g/mole; Kow = 4.4; EC, 2006a), it is unlikely that the relatively lower toxicity of difenoconazole on embryo hatching as compared to abamectin was related with the chorion. In line with this, Mu et al. (2015) noted that difenoconazole concentrations in embryos exposed to this fungicide for eight days were approximately twice those detected at four days post start exposure. Subsequently, these authors concluded that the chorion does not reduce the accumulation of difenoconazole in embryos (Mu et al., 2015).

Table 1. Selected short-term toxicity values of abamectin and ivermectin for zebrafish adults, juveniles and embryos.

Compound	Life stage	Test parameter	Test duration (d)	Endpoint	Concentration (mg/L)	Reference
Abamectin	Adult	Mortality	4	LC50	0.059	Sanches et al. (2017)
Abamectin	Adult	Mortality	4	LC50	0.055	Tişler and Erzen (2006)
Abamectin	Adult	Mortality	2	LC50	0.033	Novelli et al. (2012)
Ivermectin	Adult	Mortality	4	LC50	0.075	Oliveira et al. (2016)
Ivermectin	Adult	Mortality	4	LC50	0.073	Domingues et al. (2016)
Abamectin*	Embryo	Mortality	5	LC50	3.83	This study
Ivermectin	Embryo	Mortality	5	LC50	1.04	Oliveira et al. (2016)
Ivermectin	Embryo	Mortality	2	LC50	> 4.0	Weil et al. (2009)
Ivermectin	Juvenile	Mortality	4	LC50	0.017	Oliveira et al. (2016)
Ivermectin	Adult	Behaviour (movement, posture)	3	EC50	0.23	Oliveira et al. (2016)
Ivermectin	Adult	Behaviour (movement, posture)	3	EC10	0.023	Oliveira et al. (2016)
Abamectin	Adult	Behaviour (movement)	4	EC50	0.049	Tişler and Erzen (2006)
Abamectin	Adult	Behaviour (movement)	4	EC10	0.021	Tişler and Erzen (2006)
Ivermectin	Embryo	Behaviour (movement)	2	EC50	0.17	Weil et al. (2009)
Ivermectin	Embryo	Behaviour (movement)	2	EC10	0.17	Weil et al. (2009)
Ivermectin	Embryo	Behaviour (movement)	6	EC50	0.44	Carlsson et al. (2013)
Ivermectin	Embryo	Behaviour (movement)	6	NOEC	0.46	Carlsson et al. (2013)
Ivermectin	Embryo	Behaviour (movement)	3	EC50	0.093	Oliveira et al. (2016)
Ivermectin	Embryo	Behaviour (movement)	3	EC10	0.036	Oliveira et al. (2016)
Abamectin*	Juvenile	Behaviour (movement)	4	NOEC	0.0083	This study
Ivermectin	Juvenile	Behaviour (movement, posture)	3	EC50	0.02	Oliveira et al. (2016)
Ivermectin	Juvenile	Behaviour (movement, posture)	3	EC10	0.016	Oliveira et al. (2016)
Abamectin*	Embryo	Hatching	4	EC50	< 0.5	This study
Abamectin*	Embryo	Heart rate	2	NOEC	0.5	This study
Abamectin	Embryo	Viability, hatching, malformations	5	EC50	0.015	Padilla et al. (2012)
Ivermectin	Embryo/juvenile	Development	4	EC50	0.38	Oliveira et al. (2016)
Ivermectin	Embryo	Hatching	4	EC50	0.48	Oliveira et al. (2016)

*Results of this study refer to experiments with the commercial formulation Kraft 36EC® (36 g abamectin/L; Cheminova, Brazil). All other studies in this Table evaluated technical abamectin.

Fig. 1. Control zebrafish embryos and abnormalities noted after 96 h to 120 h exposure to abamectin or difenoconazole in the FET test: (A) healthy control embryos (96 h); (B) egg hatching delay (abamectin; 96 h); (C) oedema formation (abamectin; 96 h); (D) egg hatching delay (difenoconazole; 96 h); (E) healthy control embryos (120 h); (F) egg hatching delay and oedema formation (abamectin; 120 h); (G) dead embryo (abamectin; 120 h); (H) dead embryo (difenoconazole; 120 h).

Table 2. Selected short-term toxicity values of difenoconazole for zebrafish adults, juveniles and embryos.

Compound	Life stage	Test parameter	Test duration (d)	Endpoint	Concentration (mg/L)	Reference
Difenoconazole	Adult	Mortality	4	LC50	1.41	Sanches et al. (2017)
Difenoconazole	Adult	Mortality	4	LC50	1.45	Mu et al. (2013)
Difenoconazole	Adult	Mortality	4	LC50	1.33	Dong et al. (2013)
Difenoconazole*	Embryo	Mortality	4	LC50	3.58	This study
Difenoconazole	Embryo	Mortality	4	LC50	2.34	Mu et al. (2013)
Difenoconazole	Juvenile	Mortality	4	LC50	1.17	Mu et al. (2013)
Difenoconazole	Juvenile	Behaviour (movement)	4	NOEC	< 0.047	This study
Difenoconazole*	Embryo	Heart rate	2	NOEC	> 1.1	This study
Difenoconazole	Embryo	Heart rate, colour blackening, reversal, spine deformation	4	NOEC	0.5	Mu et al. (2013)
Difenoconazole	Embryo	Body length	4	NOEC	< 0.5	Mu et al. (2013)
Difenoconazole*	Embryo	Hatching delay	4	EC50	2.21	This study
Difenoconazole*	Embryo	Oedema formation	4	EC50	2.21	This study
Difenoconazole	Embryo	Viability, hatching, malformations	5	EC50	1.44	Padilla et al. (2012)

*Results of this study refer to experiments with the commercial formulation Score 250EC® (250 g difenoconazole/L; Syngenta Crop Protection Ltda, Brazil). All other studies in this Table evaluated technical difenoconazole.

Fig. 2. Heart rate (in # heart beats/20 s) in zebrafish embryos after 96 h exposure to the different abamectin treatments (left) and the fraction of embryos showing oedema formation 96 h after the start of different exposure levels of difenoconazole (right). * Significant difference in relation to the control.

Several alternative reasons have been pointed out for delaying or inhibition of the hatching process such as the induction of an abnormal function of the enzyme chorionase and/or the inability of the emerging embryos to break the eggshell (Moura et al., 2017). Chorionase is an enzyme that decomposes internal layers of the egg membrane and is produced by the hatching gland cells whose appearance is closely related to the moment in time at which the eye pigment appears and the heartbeat and blood circulation begin (Domingues et al., 2011). In the present study, heart beat was affected at similar pesticide concentrations as hatching (Tables 1 and 2), suggesting an effect of the pesticides on that particular stage of embryogenesis. For abamectin, however, the neurotoxic mode of action and the consequently reduced embryo movement is likely to have played the greatest role on embryo hatching success. The toxicity values for ivermectin indeed indicate that effects on embryo movements may ensue at low concentrations (Weil et al., 2009; Carlsson et al., 2013; Oliveira et al., 2016, Table 1). Difenoconazole, in turn, may affect the hatching gland by inducing yolk sac abnormalities, which may further disrupt the synthesis of the hatching enzyme chorionase, and subsequently lead to a decrease of the hatching rate (Mu et al., 2016).

3.2. Mixture toxicity in zebrafish embryos

Mixtures of pesticides with similar modes of action are usually considered to act through concentration addition (CA), whereas the independent action (IA) model is generally used with mixtures of pesticides with different modes of action (e.g. Jonker et al., 2005; Silva et al., 2015). Consequently, the IA model was applied in the present study to evaluate the response of the zebrafish embryos after exposure to the abamectin and difenoconazole mixtures, and deviations from this model were evaluated using the methodology developed by (Jonker et al., 2005). For egg coagulation and hatching, it was not possible to establish values for EC50 and

parameter b in the MIXTOX model. Subsequently, the mixture toxicity could only be determined for mortality. The results of the MIXTOX analysis of the mortality mixture toxicity data are summarized in Table 3, whereas the isobologram provided in Fig. 3 visualizes the interactive effects of the pesticide mixture. As anticipated, the derived mixture toxicity data fitted the IA model, producing a sum of the squares of the residuals (SS) of 49.41 ($p < 0.05$; $r^2 = 0.89$; Table 3). After evaluating the different deviations, the dose level-dependent deviation was noted to best describe the data, as can be deduced from the decrease in the SS value and the increase in the correlation coefficient ($p < 0.05$; $SS = 39.13$; $r^2 = 0.92$; Table 3). The parameters “ a ” (25.79 so greater than 0) and “ b_{DL} ” (1.88 so between 1 and 2) further indicated that antagonism occurred at low dose levels and synergism at high dose levels, with a change at a dose level higher than the LC_{50} value (Table 3; Jonker et al., 2005). This also becomes apparent from the convex lines in the isobologram at lower concentrations and the concave lines at higher concentrations, which indicate antagonism and synergism, respectively (Ryall and Tan, 2015, Fig. 3).

Table 3. Summary of the analysis of the abamectin and difenoconazole 96h mortality mixture toxicity data with zebrafish embryos.

	IA	S/A	DR	DL
max	0.85	0.84	0.83	0.83
β Kraft 36EC®	28.31	28.31	28.86	30.78
β Score 250EC®	16.80	16.81	11.30	17.37
LC_{50} Kraft 36EC®	5.32	5.36	5.39	5.31
LC_{50} Score 250EC®	1.08	1.10	1.14	1.05
a	-	-1.07	0.68	25.79
$b_{DR/DL}$	-	-	-3.31	1.88
SS	49.41	49.15	49.39	39.13
r^2	0.89	0.90	0.89	0.92
χ^2 or test F	419.88	0.26	0.02	10.28
df	-	1	2	2
p (χ^2/F)	1.41×10^{-89}	0.61	0.99	0.006

max = maximum value of the response; β = slope the individual response dose curve; LC_{50} = median effective concentration; a , b_{DR} and b_{DL} = s function parameters; SS = sum of the squares of the residuals; r^2 = regression coefficient; Test X^2 or F = statistical test; df = degree of freedom; p (X^2/F) = level of significance for the statistical test. IA = independent action model, S/A = deviation synergism/antagonism, DR = dose ratio-dependent deviation and DL = dose level dependent deviation.

Fig. 3. Isobologram of the pesticide mixture effects on zebrafish embryo mortality, demonstrating a dose level-dependent (DL) deviation from the independent action (IA) model that was analyzed. The linear, concave and convex isoboles represent no interaction, synergy and antagonism, respectively (Ryall and Tan, 2015).

In a previous study with zebrafish embryos, we encountered a synergistic interaction of abamectin (20 - 100 mg/L) and difenoconazole (0.5 - 2.5 mg/L), regardless of the dose level (Sanches et al., 2017). Moreira et al. (2017), however, also encountered a dose leveldependent deviation of the IA model for the Neotropical cladoceran *Macrothrix flabelligera* exposed to abamectin and difenoconazole mixtures, with antagonism at low and synergism at high pesticide mixture concentrations. Cedergreen (2014) discussed that synergistic interactions involving azole fungicides are mostly due to an inhibition of pesticide metabolism by the azole fungicide. Azole fungicides are indeed known inhibitors of a wide range of P450 monooxygenases, which are enzymes responsible for the phase I metabolism of lipophilic compounds, together with a range of biosynthesis processes, in both plants and animals (Guengerich, 2008; Walker, 2009). Hence, the toxicity of insecticides is often severely enhanced when mixed with azole fungicides (Rasmussen et al., 2012; Cedergreen, 2014), as was observed in the present study at higher pesticide mixture concentrations. The antagonistic action at lower pesticide mixture concentrations may be related with the concentration-dependent action of ivermectin as shown by Zemkova et al. (2014). These authors discussed that in most of the ivermectin-sensitive channels, the effects of ivermectin include the potentiation of agonist-induced currents at low concentrations and channel opening at higher concentrations (Zemkova et al., 2014). The exact underlying toxic mechanisms for the

observed mixture toxicity, however, may only be elucidated through future studies at the molecular level. Toxicokinetic-toxicodynamic (TKTD) models have increasingly been used in the analysis of toxicity data for single-chemical exposure (e.g. EFSA, 2013). Models of this type are hence also absolutely crucial for a more mechanistic understanding of chemical mixture toxicology (Jager et al., 2014).

3.3. Effects on juvenile locomotor activity

The locomotor activity of free-swimming larvae in four alternating 5-min cycles of light and dark after 120 h single exposures to sublethal concentrations of the test compounds is visualized in Fig. 4. From this Figure, it can be deduced that both control and pesticide-treated larvae showed a greater activity in dark than light cycles. In line with this, zebrafish larvae are known to have less locomotion during light periods than in the dark (Andrade et al., 2016).

Fig. 4. Juvenile locomotor activity (in mm travelled) during four alternating 5-min cycles of light and dark following exposure to abamectin (left) and difenoconazole (right).

Exposure to the highest two abamectin concentrations led to a significant reduction immediately in the first cycle and persisted throughout the other three cycles (NOEC = 8.3 mg/L; Table 1; Fig. 4). This immediate response is probable related with the neurotoxic mode of action of abamectin since alteration of locomotor behaviour has been linked with neurological impairment (Andrade et al., 2016). Oliveira et al. (2016) recorded a comparable sensitivity of juvenile zebrafish in terms of locomotion/posture after short-term waterborne exposure to ivermectin concentrations (Table 1). Longer-term exposure to ivermectin through the water may even increase the impact on juvenile movement and result in fish remaining at the bottom water layer (21d-NOEC < 0.25 mg/L; Domingues et al., 2016).

No effects on locomotion were noted during the first cycle at any of the difenoconazole concentrations evaluated, whereas in subsequent cycles all fungicide test concentrations showed significant effects ($\text{NOEC} < 0.047 \text{ mg/L}$; Table 2). It should be noted, however, that the severity of locomotion reduction ($15 \pm 8\%$) in affected treatments was on average half of that in abamectin treatments leading to locomotion reduction ($32 \pm 6\%$). As discussed above, toxic effects of difenoconazole in fish are not expected to result from a specific mode of action like neurotoxicity but rather from general or systemic toxicity (EC, 2006a). Behavioural alterations in fish, however, may result from effects on several physiological systems such as the neurological, sensorial, hormonal, and metabolic systems (Scott and Sloman, 2004; Tierney, 2011; Andrade et al., 2016). Locomotor impairment of zebrafish larvae has, for example, been associated with increased metabolic costs and hence energy losses from detoxification and repair processes after chemical exposure (Andrade et al., 2016; Abe et al., 2018). It is possible that this may also explain the small reduction in locomotor activity noted in the lower difenoconazole treatments of the present study.

3.4. Most sensitive life stage and implications for use of early life stage test in risk assessment

The LC_{50} value derived in the present study for embryos (3.83 mg/L) indicates a lower sensitivity than we previously established for adults ($\text{LC}_{50} = 0.059 \text{ mg/L}$; Sanches et al., 2017). Other studies have also indicated that the order of lethal sensitivity to abamectin and difenoconazole for different life stages is juvenile > adult > embryo (Mu et al., 2013; Oliveira et al., 2016, Tables 1 and 2). As discussed above, this relatively low embryo sensitivity is not likely to be related with a possible protective action of the chorion. Mu et al. (2015), for example, noted that difenoconazole bioaccumulation in zebrafish embryos and adult zebrafish after waterborne exposure was comparable. Under real-world conditions, however, adult exposure may be expected to be greater than embryos and yolk-sac fry through feeding on pesticide contaminated food. Ucan-Marín et al. (2012), for example, demonstrated toxic effects after administration of ivermectin via food. In waterborne-exposure studies, however, the immaturity of potential molecular targets of test compounds in embryos is likely to play a more significant role (Oliveira et al., 2016). This and previous studies clearly demonstrate that sublethal parameters, especially those related with locomotion, are considerably more sensitive than lethality (Tables 1 and 2). Sublethal changes (feeding, swimming, etc.) may pose significant ecological impacts, e.g. in predator-prey interactions by decreasing predator success and increasing prey susceptibility to predation (Domingues et al., 2016). In addition,

although juveniles also appear to be the most sensitive life stage to sublethal effects of abamectin, differences with embryos and adults are less pronounced than for mortality (Oliveira et al., 2016, Table 1). Subsequently, the inclusion of sublethal parameters may greatly improve the sensitivity of FET tests and hence its suitability as a substitution of adult fish testing in risk assessment evaluations. The 96 h-LC50 values of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) used in the European prospective acute risk evaluation of abamectin and difenoconazole to fish are 2.3 - 2-6 mg/L (EC, 2006b) and 1100 mg/L (EC, 2006a), respectively. These values indicate a three-to four-fold greater sensitivity than juvenile locomotion after abamectin exposure (NOEC = 8.3 mg/L), but a much lower sensitivity after difenoconazole exposure (NOEC < 0.047 mg/L). For difenonazole, the sublethal effects noted on zebrafish embryos were also in the range of the 96 h-LC50 for rainbow trout, whereas for abamectin the embryo toxicity data were clearly not protective. The relative sensitivity of embryo and adult fish indeed appears to be compound-specific depending on the mode of action of the compound evaluated (Lammer et al., 2009). In addition, the fish embryo toxicity test endpoints have been shown to be particularly insensitive to neurotoxicants like abamectin (Glaberman et al., 2017). This has been explained by the fact that oxygen in zebrafish embryo is mainly supplied via diffusion through the skin and an impairment of neuronal function does therefore not lead to mortality (Klüver et al., 2016). Further studies are needed to determine to what extent the FET and juvenile tests may serve as surrogates for the adult fish acute toxicity test in risk assessments and, more specifically, for which type of compounds. This may also aid in determining whether an additional assessment factor is warranted (beside the factor 100 applied to the 96 h-LC50 value derived in AFT tests) to early life stage toxicity values for the setting of Regulatory Acceptable Concentrations (RACs).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank the São Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP) for their financial support (Process number: 2014/14621-0 and 2017/055433). This work was also supported by the Brazilian government through the Special Visiting Researcher program (MEC/MCTI/ CAPES/CNPq/FAPs reference 402392/2013-2) and the Portuguese government (FCT) through a postdoc grant for the last author (SFRH/BPD/109199/2015) and the research unit UID/AMB/04085/ 2013 (CENSE).

References

- Abe, F.R., Soares, A.M.V.M., de Oliveira, D.P., Gravato, C., 2018. Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: cellular energy allocation and neurotoxicity. *Environ. Pollut.* 235, 255-262.
- Albuquerque, A.F., Ribeiro, J.S., Kummrow, F., Nogueira, A.J.A., Montagner, C.C., Umbuzeiro, G.A., 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environ. Sci. Process Impacts* 18, 779-787.
- Andrade, T.S., Henriques, J.F., Almeida, A.R., Machado, A.L., Koba, O., Giang, P.T., Soares, A.M.V.M., Domingues, I., 2016. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 170, 390-399.
- Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D., Strecker, R., 2015. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 16247-16261.
- Campbell, W.C., 1989. Ivermectin and Abamectin. Springer Verlag, New York.
- Carriquiriborde, P., Mirabella, P., Waichman, A., Solomon, K., Van den Brink, P.J., Maund, S., 2014. Aquatic risk assessment of pesticides in Latin America. *Integrated Environ. Assess. Manag.* 10, 539-542.
- Carlsson, G., Patring, J., Kreuger, J., Norrgren, L., Oskarsson, A., 2013. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 126, 30-41.
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One* 9, e96580.
- Daam, M.A., Van den Brink, P.J., 2010. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. *Ecotoxicology* 19, 24-37.
- Dang, Z., van der Ven, L.T.M., Kienhuis, A.S., 2017. Fish embryo toxicity test, threshold approach, and moribund as approaches to implement 3R principles to the acute fish toxicity test. *Chemosphere* 186, 677-685.

- Domingues, I., Oliveira, R., Lourenço, J., Grisolia, C.K., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., 2010. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 152, 338-345.
- Domingues, I., Oliveira, R., Musso, C., Cardoso, M., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2011. Prochloraz effects on biomarkers activity in zebrafish early life stages and adults. *Environ. Toxicol.* 28, 155-163.
- Domingues, I., Oliveira, R., Soares, A.M.V.M., Amorim, M.J.B., 2016. Effects of ivermectin on *Danio rerio* e a multiple endpoint approach e behaviour, weight and subcellular markers. *Ecotoxicology* 25, 491-499.
- Dong, F., Li, J., Chankvetadze, B., Cheng, Y., Xu, J., Liu, X., Li, Y., Chen, X., Bertucci, C., Tedesco, D., Zanasi, R., Zheng, Y., 2013. Chiral triazole fungicide difenoconazole: absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3386-3394.
- [EC] European Commission, 2006a. Draft Assessment Report (DAR) e Public Version e Initial Risk Assessment provided by the Rapporteur Member State Sweden for the Existing Active Substance Difenoconazole of the Third Stage (Part a) of the Review Programme Referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC.
- [EC] European Commission, 2006b. Draft Assessment Report (DAR) e Public Version e Initial Risk Assessment provided by the Rapporteur Member State the Netherlands for the Existing Active Substance Abamectin of the Third Stage (Part a) of the Review Programme Referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC.
- [ECHA/UBA] European Chemicals Agency/German Environment Agency (Umweltbundesamt), 2017. Expert Workshop on the Potential Regulatory Application of the Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test under REACH, CLP and the BPR. Available via. https://echa.europa.eu/documents/10162/13630/fet_workshop_proceedings_en.pdf/a987ccab-5d4a-a226-2a73-994be484ca8d.
- [EFSA] European Food Safety Authority, 2013. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in the edge-of-field surface waters. *EFSA J.* 11, 3290.

- Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Leonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat. Toxicol.* 97, 79-87.
- Glaberman, S., Padilla, S., Barron, M.G., 2017. Evaluating the zebrafish embryo test for pesticide hazard screening. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 1221-1226.
- Guengerich, F.P., 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 70e83.
- Høy, T., Horsberg, T.E., Nafstad, I., 1990. The disposition of ivermectin in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Pharmacol. Toxicol.* 67, 307-312.
- Jager, T., Gudmundsdottir, E.M., Cedergreen, N., 2014. Dynamic modeling of sublethal mixture toxicity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7026-7033.
- 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 ratiodependent effects in mixture dose response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701-2713.
- Katharios, P., Pavlidis, M., Iliopoulou-Georgudaki, J., 2004. Accumulation of ivermectin in the brain of sea bream, *Sparus aurata* after intraperitoneal administration. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 17, 9-12.
- Klüver, N., Vogs, C., Altenburger, R., Escher, B.I., Scholz, S., 2016. Development of a general baseline toxicity QSAR model for the fish embryo acute toxicity test. *Chemosphere* 164, 164-173.
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 196-209.

- Lewis, S.E., Silburn, D.M., Kookana, R.S., Shaw, M., 2016. Pesticide behavior, fate, and effects in the tropics: an overview of the current state of knowledge. *J. Agric. Food Chem.* 64, 3917-3924.
- Moreira, R.A., Daam, M.A., Vieira, B.H., Sanches, A.L.M., Reghini, M.V., Mansano, A.S., Freitas, E.C., Espindola, E.L.G., Rocha, O., 2017. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. *Aquat. Toxicol.* 185, 58-66.
- Moura, M.A.M., Oliveira, R., Jonsson, C.M., Domingues, I., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., 2017. The sugarcane herbicide ametryn induces oxidative stress and developmental abnormalities in zebrafish embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s1135>.
- Mu, X., Pang, S., Sun, X., Gao, J., Chen, J., Chen, X., Li, X., Wang, C., 2013. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environ. Pollut.* 175, 147-157.
- Mu, X., Chai, T., Wang, K., Zhang, J., Zhu, L., Li, X., Wang, C., 2015. Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio rerio*) during different life stages. *Aquat. Toxicol.* 160, 57-68.
- Mu, X., Chai, T., Wang, K., Zhu, L., Huang, Y., Shen, G., Li, Y., Li, X., Wang, C., 2016. The developmental effect of difenoconazole on zebrafish embryos: a mechanism research. *Environ. Pollut.* 212, 18-26.
- Novelli, A., Vieira, B.H., Cordeiro, D., Cappelini, L.T.D., Vieira, E.M., Espindola, E.L.G., 2012. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere* 86, 36-40.
- Nunes, M.E.T., 2010. Assessment of Pesticides Effects on Soil Fauna through Ecotoxicological Tests with *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) and Natural Soil Fauna Community. Doctoral thesis. University of São Paulo, Brazil.
- Nunes, M.E.T., Espindola, E.L.G., 2012. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology* 21, 1063-1071.

- [OECD] Organization for Economic Cooperation and Development, 2013. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.
- Oliveira, R., Grisolia, C.K., Monteiro, M.S., Soares, A.M.V.M., Domingues, I., 2016. Multilevel assessment of ivermectin effects using different zebrafish life stages. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 187, 50-61.
- Padilla, S., Corum, D., Padnos, B., Hunter, D.L., Beam, A., Houck, K.A., Sipes, N., Kleinstreuer, N., Knudsen, T., Dix, D.J., Reif, D.M., 2012. Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. *Reprod. Toxicol.* 33, 174-187.
- Pelka, K.E., Henn, K., Keck, A., Sapel, B., Braunbeck, T., 2017. Size does matter e determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 185, 1-10.
- Raftery, T.D., Isales, G.M., Yozzo, K.L., Volz, D.C., 2014. High-content screening assay for identification of chemicals impacting spontaneous activity in zebrafish embryos. *Environ. Sci. Technol.* 48, 804-810.
- Rasmussen, J.J., Monberg, R.J., Baattrup-Pedersen, A., Cedergreen, N., WibergLarsen, P., Strobel, B., Kronvang, B., 2012. Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders. *Aquat. Toxicol.* 118/119, 54-61.
- Rocha, O., Neto, A.J.G., Lima, J.C.S., Freitas, E.C., Miguel, M., Mansano, A.S., Moreira, R.A., Daam, M.A., 2018. Sensitivities of Three Tropical Indigenous Freshwater Invertebrates to Single and Mixture Exposures of Diuron and Carbofuran and Their Commercial Formulations. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1921-9>.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Techniques*. Methuen, London UK.
- Ryall, K.A., Tan, A., 2015. Systems biology approaches for advancing the discovery of effective drug combinations. *J. Cheminf.* 7, 1-15.
- Sanches, A.L.M., Vieira, B.H., Reghini, M.V., Moreira, R.A., Freitas, E.C., Espíndola, E.L.G., Daam, M.A., 2017. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 188, 582-587.

- Sanchez-Bayo, F., Hyne, R.V., 2011. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. *Integrated Environ. Assess. Manag.* 7, 577-586.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369-392.
- Silva, E., Daam, M.A., Cerejeira, M.J., 2015. Predicting the aquatic risk of realistic pesticide mixtures to species assemblages in Portuguese river basins. *J. Environ. Sci.* 31, 12-20.
- Sobanska, M., Scholz, S., Nyman, A.M., Cesnaitis, R., Alonso, S.G., Klüver, N., Kühne, R., Tyle, H., de Knecht, J., Dang, Z., Lundbergh, I., Carlon, C., De Coen, W., 2018. Applicability of the fish embryo acute toxicity (FET) test (OECD 236) in the regulatory context of registration, evaluation, authorisation, and restriction of chemicals (REACH). *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 657-670.
- Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 381-389.
- Tisler, T., Erzen, N.K., 2006. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology* 15, 495-502.
- Ucan-Marín, F., Ernst, W., O'Dor, R.K., Sherry, J., 2012. Effects of food borne ivermectin on juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): survival, growth, behavior, and physiology. *Aquaculture* 334, 169-175.
- Walker, C.H., 2009. Factors determining the toxicity of organic pollutants to animals and plants. In: *Organic Pollutants*. CRC Press, London, pp. 17-66.
- Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K., 2009. Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1970-1978.
- Zemkova, H., Tvrdonova, V., Bhattacharya, A., Jindrichova, M., 2014. Allosteric modulation of ligand gated ion channels by ivermectin. *Physiol. Res.* 63 (Suppl. 1), S215-S224.
- Zucchi, S., Blüthgen, N., Ieronimo, A., Fent, K., 2011. The UV-absorber benzophenone-4 alters transcripts of genes involved in hormonal pathways in zebrafish (*Danio rerio*) eleuthero-embryos and adult males. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 250, 137-146.

APÊNDICE C – Aclimação, biometria, testes de sensibilidade e variáveis físico-químicas com adultos de *Danio rerio*

Aclimação

Peixes adultos da espécie *Danio rerio*, utilizados como organismos teste nos experimentos, foram adquiridos em lotes homogêneos na Piscicultura São Matheus, localizada na cidade de São Carlos, SP, Brasil. Os organismos foram aclimatados com água reconstituída pH 7,0 – 7,6; dureza 40 – 48 mg L⁻¹ CaCO₃ L⁻¹ (água de diluição – ABNT/NBR 15088/2011) até o início dos experimentos em aquários de vidro de 90L, no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), localizado no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da Universidade de São Paulo (USP), Brasil. Os peixes foram mantidos sob aeração constante (oxigênio dissolvido > 6,0 mg L⁻¹), a 25°C ± 2,0°C, e em foto período de 12h claro-escuro. Os peixes foram alimentados diariamente na fase de aclimação com Tetramin® (Figura 1).

Figura C. 1 – Fotos dos adultos de *Danio rerio* cultivados e obtidos em piscicultura sendo aclimatados no laboratório em aquários

Biometria

Seguindo recomendações da (ABNT/NBR 15088/2011), realizou-se a biometria com pelo menos 10% dos organismos de cada lote. As médias ± desvio padrão do tamanho e peso dos organismos em todos os lotes foram 2,8 ± 0,4 cm e 0,4 ± 0,1 g. As médias de tamanho e peso dos organismos em cada lote utilizado estão apresentados na Tabela 1. Pode-se observar que foram utilizados lotes homogêneos de peixes *Danio rerio* em todos os experimentos realizados, evidenciados pelos baixos desvios apresentados.

Tabela C. 1 - Biometria dos lotes de peixes *Danio rerio* utilizados em todos os experimentos

Lotes	Média	Média
	Tamanho $\pm$ desvio padrão (cm)	Peso $\pm$ desvio padrão (g)
10/11/2014	2,7 $\pm$ 0,21	0,49 $\pm$ 0,13
21/01/2015	2,4 $\pm$ 0,23	0,24 $\pm$ 0,09
02/03/2015	2,3 $\pm$ 0,26	0,23 $\pm$ 0,08
23/03/2015	2,8 $\pm$ 0,29	0,46 $\pm$ 0,10
01/12/2015	2,7 $\pm$ 0,29	0,44 $\pm$ 0,14
07/01/2016	3,0 $\pm$ 0,16	0,48 $\pm$ 0,11
15/01/2016	2,9 $\pm$ 0,24	0,44 $\pm$ 0,10
19/01/2016	2,8 $\pm$ 0,36	0,40 $\pm$ 0,15

Testes de sensibilidade

Além da biometria, e seguindo mais uma vez as recomendações da (ABNT/NBR 15088/2011), foram realizados testes de sensibilidade com o sal de referência cloreto de potássio (KCl), a fim de avaliar as condições fisiológicas dos peixes utilizados nos experimentos. A média $\pm$ desvio padrão das CL₅₀, 48h dos oito testes de sensibilidade realizados com o sal de referência cloreto de potássio foi de 1,0 $\pm$ 0,2 g L⁻¹ e os limites superiores e inferiores foram 0,5 e 1,5 g L⁻¹, respectivamente. Com os testes de sensibilidade pode-se observar que os lotes de peixes de *Danio rerio* utilizados nos experimentos, além de serem homogêneos, apresentaram-se saudáveis, uma vez que a sensibilidade em relação à toxicidade ao sal de referência KCl foram próximas e dentro do limite inferior e superior permitido para validação dos testes (Figura 2) (ABNT, 2016). Em outros trabalhos realizados pelo grupo utilizando o *Danio rerio* foram observadas CL₅₀, 48h ao KCl semelhantes e dentro dos limites nos testes de sensibilidade realizados (NOVELLI et al., 2012, 2016; VANDERLEI, 2015).

Figura C. 2 - Curva de sensibilidade dos lotes de peixes *Danio rerio* utilizados em todos os experimentos

Variáveis físico-químicas dos experimentos de laboratório – testes de toxicidade

Algumas variáveis físico-químicas foram analisadas na água no início e no final dos experimentos como a temperatura (°C), pH (Mi-cronal B374 potentiometer) e oxigênio dissolvido (OD YSI meter), e as médias $\pm$ desvio padrão encontram-se na Tabela 2.

Tabela C. 2 - Média $\pm$ desvio padrão das variáveis físico-químicas medidas no início e ao final dos experimentos realizados em laboratório

Experimentos/variáveis	Temperatura (°C)	pH	O ₂ dissolvido (mg L ⁻¹)
		(início / fim)	(início / fim)
Testes de sensibilidade	23,9 $\pm$ 0,4	7,33 $\pm$ 0,05 / 7,12 $\pm$ 0,06	7,36 $\pm$ 0,02 / 5,29 $\pm$ 0,65
Testes abamectina	23,7 $\pm$ 0,3	7,69 $\pm$ 0,04 / 6,93 $\pm$ 0,14	7,29 $\pm$ 0,02 / 5,57 $\pm$ 0,37
Testes difenoconazol	23,7 $\pm$ 0,3	7,72 $\pm$ 0,02 / 6,87 $\pm$ 0,04	7,26 $\pm$ 0,01 / 5,12 $\pm$ 0,09
Testes Kraft 36EC®	23,5 $\pm$ 0,3	7,74 $\pm$ 0,02 / 7,14 $\pm$ 0,06	7,03 $\pm$ 0,16 / 4,63 $\pm$ 0,06
Testes Score 250EC®	23,5 $\pm$ 0,3	7,38 $\pm$ 0,52 / 7,69 $\pm$ 0,09	6,91 $\pm$ 0,12 / 4,75 $\pm$ 0,38
Testes de misturas i.a.	23,7 $\pm$ 0,3	7,69 $\pm$ 0,54 / 7,31 $\pm$ 0,05	7,34 $\pm$ 0,03 / 5,92 $\pm$ 0,67
Testes de misturas f.c.	23,5 $\pm$ 0,3	7,72 $\pm$ 0,34 / 7,58 $\pm$ 0,22	7,42 $\pm$ 0,01 / 6,51 $\pm$ 0,24

A água contaminada em todos os experimentos, bem como todos os resíduos químicos produzidos durante as análises, foi devidamente separada, identificada e encaminhada ao entreposto do setor de Tratamento de Resíduos Químicos da EESC/USP.

Variáveis físico-químicas dos experimentos de laboratório – análise de biomarcadores

Algumas variáveis físico-químicas foram analisadas na água no início e no final dos experimentos de laboratório para análise dos biomarcadores como a temperatura (°C), pH (Mi-cronal B374 potentiometer), oxigênio dissolvido (OD YSI meter) e amônia (HANSEN; KOROLEFF, 1999). Os ensaios foram realizados em ambiente climatizado e a temperatura média da água foi de 24,2 $\pm$ 0,3 °C. As médias $\pm$ desvio padrão das demais variáveis podem ser observados na Tabela 3.

Tabela C. 3 - Médias e desvios da concentração de amônia ($\mu\text{g L}^{-1}$), pH e oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) medidos nos experimentos de exposição em laboratório para a determinação de biomarcadores

Tratamentos	Amônia ($\mu\text{g L}^{-1}$)	pH (início / fim)	O ₂ dissolvido (mg L^{-1}) (início / fim)
Controle	262,8 $\pm$ 92,7	7,77 / 7,3 $\pm$ 0,03	7,23 / 5,8 $\pm$ 0,12
Controle solvente	223,2 $\pm$ 58,2	7,2 $\pm$ 0,04	5,1 $\pm$ 0,11
Abamectina	219,5 $\pm$ 40,7	7,2 $\pm$ 0,01	5,5 $\pm$ 0,07
Kraft 36EC®	250,3 $\pm$ 99,7	7,2 $\pm$ 0,04	5,8 $\pm$ 0,28
Difenoconazol	164,8 $\pm$ 44,8	7,1 $\pm$ 0,01	5,1 $\pm$ 0,15
Score 250EC®	220,8 $\pm$ 35,1	7,2 $\pm$ 0,05	5,3 $\pm$ 0,26
Aba + Difeno	226,9 $\pm$ 72,8	7,1 $\pm$ 0,03	4,9 $\pm$ 0,09
Kraft 36EC® + Score 250EC®	466,2 $\pm$ 97,7	7,1 $\pm$ 0,04	4,9 $\pm$ 0,43

Variáveis físico-químicas – experimento mesocosmos

Foram realizadas seis coletas de amostras de água para a determinação de algumas variáveis físicas, químicas e biológicas. As análises de todas as variáveis foram realizadas no laboratório de Limnologia do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP), localizado no município de Itirapina, SP. As tabelas com as médias $\pm$ desvio padrão dos resultados podem ser observados nas Tabelas de 4 a 14.

Tabela C. 4 - Médias $\pm$ desvio padrão de pH medidos no período da manhã

Medidas de pH (manhã)	19/03/2015 Semana anterior à contaminação	23/03/2015 Introdução dos peixes	25/03/2015 Dia anterior à contaminação	26/03/2015 Contaminação	27/03/2015 Dia após à contaminação	30/03/2015 Retirada dos peixes
Controle	7,17 $\pm$ 0,31	-	5,92 $\pm$ 0,24	6,76 $\pm$ 0,15	6,41 $\pm$ 0,39	6,12 $\pm$ 0,58
Controle runoff	7,13 $\pm$ 0,20	-	6,0 $\pm$ 0,19	6,46 $\pm$ 0,13	6,39 $\pm$ 0,30	6,01 $\pm$ 0,35
Kraft runoff	7,03 $\pm$ 0,11	-	5,92 $\pm$ 0,16	6,33 $\pm$ 0,04	6,43 $\pm$ 0,23	6,02 $\pm$ 0,28
Score runoff	7,05 $\pm$ 0,25	-	5,97 $\pm$ 0,18	6,18 $\pm$ 0,04	6,32 $\pm$ 0,19	5,89 $\pm$ 0,26
K+ S runoff	7,05 $\pm$ 0,28	-	5,98 $\pm$ 0,18	6,05 $\pm$ 0,04	6,25 $\pm$ 0,21	5,77 $\pm$ 0,16
Kraft spray	7,02 $\pm$ 0,16	-	6,0 $\pm$ 0,12	6,12 $\pm$ 0,03	6,21 $\pm$ 0,23	5,74 $\pm$ 0,13
Score spray	6,98 $\pm$ 0,12	-	6,0 $\pm$ 0,11	6,1 $\pm$ 0,04	6,24 $\pm$ 0,22	5,75 $\pm$ 0,07
K + S spray	6,94 $\pm$ 0,12	-	6,05 $\pm$ 0,11	6,52 $\pm$ 0,56	6,27 $\pm$ 0,21	5,93 $\pm$ 0,13

Tabela C. 5 - Médias $\pm$ desvio padrão de pH medidos no período da tarde

Medidas de pH (tarde)	19/03/2015 Semana anterior à contaminação	23/03/2015 Introdução dos peixes	25/03/2015 Dia anterior à contaminação	26/03/2015 Contaminação	27/03/2015 Dia após à contaminação	30/03/2015 Retirada dos peixes
Controle	8,38 $\pm$ 0,43	8,65 $\pm$ 0,31	7,68 $\pm$ 0,44	7,83 $\pm$ 0,50	7,36 $\pm$ 0,40	7,04 $\pm$ 0,42
Controle runoff	8,29 $\pm$ 0,49	8,75 $\pm$ 0,14	7,81 $\pm$ 0,25	7,16 $\pm$ 0,21	7,60 $\pm$ 0,20	6,89 $\pm$ 0,32
Kraft runoff	8,26 $\pm$ 0,46	8,64 $\pm$ 0,25	7,77 $\pm$ 0,23	6,65 $\pm$ 0,03	7,07 $\pm$ 0,55	6,9 $\pm$ 0,27
Score runoff	8,23 $\pm$ 0,42	8,49 $\pm$ 0,26	7,73 $\pm$ 0,36	6,71 $\pm$ 0,08	7,13 $\pm$ 0,56	6,78 $\pm$ 0,33
K+ S runoff	8,36 $\pm$ 0,48	8,60 $\pm$ 0,29	7,71 $\pm$ 0,26	7,38 $\pm$ 0,08	7,03 $\pm$ 0,54	6,58 $\pm$ 0,20
Kraft spray	8,44 $\pm$ 0,23	8,58 $\pm$ 0,13	7,78 $\pm$ 0,16	7,63 $\pm$ 0,21	7,26 $\pm$ 0,15	6,9 $\pm$ 0,24
Score spray	8,42 $\pm$ 0,29	8,59 $\pm$ 0,31	7,78 $\pm$ 0,20	7,42 $\pm$ 0,30	7,60 $\pm$ 0,21	7,08 $\pm$ 0,32
K + S spray	8,46 $\pm$ 0,28	8,65 $\pm$ 0,13	7,83 $\pm$ 0,17	7,8 $\pm$ 0,07	7,77 $\pm$ 0,15	7,48 $\pm$ 0,08

Tabela C. 6 - Médias $\pm$ desvio padrão de condutividade medida no período da manhã

Condutividade $\mu\text{S}/\text{cm}$ (manhã)	19/03/2015 Semana anterior à contaminação	23/03/2015 Introdução dos peixes	25/03/2015 Dia anterior à contaminação	26/03/2015 Contaminação	27/03/2015 Dia após à contaminação	30/03/2015 Retirada dos peixes
Controle	38 $\pm$ 4,0	-	25 $\pm$ 4,0	25 $\pm$ 4,0	26 $\pm$ 4,0	28 $\pm$ 6,0
Controle runoff	26 $\pm$ 4,0	-	23 $\pm$ 4,0	23 $\pm$ 4,0	25 $\pm$ 4,0	27 $\pm$ 4,0
Kraft runoff	24 $\pm$ 4,0	-	21 $\pm$ 4,0	21 $\pm$ 4,0	22 $\pm$ 4,0	24 $\pm$ 4,0
Score runoff	24 $\pm$ 6,0	-	22 $\pm$ 5,0	21 $\pm$ 5,0	23 $\pm$ 6,0	28 $\pm$ 7,0
K + S runoff	27 $\pm$ 3,0	-	24 $\pm$ 3,0	24 $\pm$ 3,0	25 $\pm$ 2,0	30 $\pm$ 2,0
Kraft spray	27 $\pm$ 2,0	-	24 $\pm$ 4,0	23 $\pm$ 4,0	25 $\pm$ 5,0	25 $\pm$ 6,0
Score spray	28 $\pm$ 4,0	-	26 $\pm$ 6,0	26 $\pm$ 6,0	27 $\pm$ 7,0	28 $\pm$ 8,0
K + S spray	23 $\pm$ 3,0	-	21 $\pm$ 2,0	21 $\pm$ 2,0	22 $\pm$ 2,0	23 $\pm$ 2,0

Tabela C. 7 - Médias $\pm$ desvio padrão de condutividade medida no período da tarde

Condutividade $\mu\text{S}/\text{cm}$ (tarde)	19/03/2015 Semana anterior à contaminação	23/03/2015 Introdução dos peixes	25/03/2015 Dia anterior à contaminação	26/03/2015 Contaminação	27/03/2015 Dia após à contaminação	30/03/2015 Retirada dos peixes
Controle	28 $\pm$ 1,0	27 $\pm$ 2,0	26 $\pm$ 3,0	28 $\pm$ 3,0	28 $\pm$ 3,0	27 $\pm$ 4,0
Controle runoff	27 $\pm$ 3,0	25 $\pm$ 3,0	25 $\pm$ 3,0	24 $\pm$ 3,0	25 $\pm$ 8,0	25 $\pm$ 4,0
Kraft runoff	26 $\pm$ 2,0	24 $\pm$ 4,0	23 $\pm$ 4,0	22 $\pm$ 4,0	26 $\pm$ 1,0	23 $\pm$ 4,0
Score runoff	24 $\pm$ 1,0	23 $\pm$ 5,0	23 $\pm$ 5,0	22 $\pm$ 6,0	24 $\pm$ 6,0	24 $\pm$ 5,0
K + S runoff	27 $\pm$ 1,0	26 $\pm$ 1,0	25 $\pm$ 2,0	26 $\pm$ 2,0	24 $\pm$ 5,0	29 $\pm$ 2,0
Kraft spray	28 $\pm$ 2,0	25 $\pm$ 3,0	25 $\pm$ 3,0	25 $\pm$ 3,0	26 $\pm$ 4,0	23 $\pm$ 6,0
Score spray	29 $\pm$ 3,0	28 $\pm$ 3,0	28 $\pm$ 4,0	29 $\pm$ 4,0	21 $\pm$ 7,0	27 $\pm$ 7,0
K + S spray	24 $\pm$ 3,0	23 $\pm$ 4,0	23 $\pm$ 3,0	24 $\pm$ 2,0	25 $\pm$ 4,0	23 $\pm$ 2,0

Tabela C. 8 - Médias $\pm$ desvio padrão de oxigênio dissolvido medido no período da manhã

Oxigênio dissolvido mg/L (manhã)	19/03/2015 Semana anterior à contaminação	23/03/2015 Introdução dos peixes	25/03/2015 Dia anterior à contaminação	26/03/2015 Contaminação	27/03/2015 Dia após à contaminação	30/03/2015 Retirada dos peixes
Controle	8,25 $\pm$ 0,07	-	7,99 $\pm$ 0,31	7,17 $\pm$ 0,13	7,25 $\pm$ 0,24	6,81 $\pm$ 0,07
Controle runoff	8,27 $\pm$ 0,06	-	7,98 $\pm$ 0,28	7,07 $\pm$ 0,04	7,37 $\pm$ 0,12	6,82 $\pm$ 0,07
Kraft runoff	8,27 $\pm$ 0,02	-	7,97 $\pm$ 0,21	7,16 $\pm$ 0,03	7,41 $\pm$ 0,06	6,86 $\pm$ 0,05
Score runoff	8,27 $\pm$ 0,04	-	8,04 $\pm$,26	7,04 $\pm$ 0,14	7,40 $\pm$ 0,11	6,87 $\pm$ 0,09
K + S runoff	8,25 $\pm$ 0,04	-	7,95 $\pm$ 0,02	7,09 $\pm$ 0,07	7,40 $\pm$ 0,10	6,9 $\pm$ 0,05
Kraft spray	8,27 $\pm$ 0,05	-	7,96 $\pm$ 0,06	7,12 $\pm$ 0,02	7,34 $\pm$ 0,07	6,83 $\pm$ 0,05
Score spray	8,27 $\pm$ 0,03	-	7,93 $\pm$ 0,12	7,05 $\pm$ 0,01	7,34 $\pm$ 0,04	6,81 $\pm$ 0,03
K + S spray	8,30 $\pm$ 0,02	-	7,95 $\pm$ 0,12	7,01 $\pm$ 0,05	7,33 $\pm$ 0,08	6,83 $\pm$ 0,03

Tabela C. 9 - Médias $\pm$ desvio padrão de oxigênio dissolvido medido no período da tarde

Oxigênio dissolvido mg/L (tarde)	19/03/2015 Semana anterior à contaminação	23/03/2015 Introdução dos peixes	25/03/2015 Dia anterior à contaminação	26/03/2015 Contaminação	27/03/2015 Dia após à contaminação	30/03/2015 Retirada dos peixes
Controle	7,54 $\pm$ 0,08	6,24 $\pm$ 0,23	5,43 $\pm$ 0,14	5,62 $\pm$ 0,17	5,23 $\pm$ 0,05	6,43 $\pm$ 0,08
Controle runoff	7,58 $\pm$ 0,06	6,26 $\pm$ 0,22	5,37 $\pm$ 0,08	6,01 $\pm$ 0,15	5,3 $\pm$ 0,055	6,52 $\pm$ 0,10
Kraft runoff	7,53 $\pm$ 0,05	6,14 $\pm$ 0,16	5,36 $\pm$ 0,08	5,81 $\pm$ 0,22	5,43 $\pm$ 0,34	6,53 $\pm$ 0,05
Score runoff	7,57 $\pm$ 0,09	6,19 $\pm$ 0,19	5,33 $\pm$ 0,12	5,97 $\pm$ 0,14	5,27 $\pm$ 0,12	6,57 $\pm$ 0,05
K + S runoff	7,50 $\pm$ 0,11	6,3 $\pm$ 0,21	5,35 $\pm$ 0,07	5,94 $\pm$ 0,02	5,29 $\pm$ 0,12	6,61 $\pm$ 0,06
Kraft spray	7,57 $\pm$ 0,06	6,29 $\pm$ 0,13	5,43 $\pm$ 0,13	5,7 $\pm$ 0,11	5,24 $\pm$ 0,12	6,54 $\pm$ 0,09
Score spray	7,58 $\pm$ 0,03	6,27 $\pm$ 0,05	5,39 $\pm$ 0,09	5,61 $\pm$ 0,06	5,25 $\pm$ 0,07	6,50 $\pm$ 0,01
K + S spray	7,57 $\pm$ 0,07	6,23 $\pm$ 0,07	5,31 $\pm$ 0,10	5,53 $\pm$ 0,12	5,21 $\pm$ 0,03	6,49 $\pm$ 0,03

Tabela C. 10 - Médias $\pm$ desvio padrão das medidas de temperatura medida no período da manhã

Temperatura $^{\circ}\text{C}$ (manhã)	19/03/2015 Semana anterior à contaminação	23/03/2015 Introdução dos peixes	25/03/2015 Dia anterior à contaminação	26/03/2015 Contaminação	27/03/2015 Dia após à contaminação	30/03/2015 Retirada dos peixes
Controle	20,7 $\pm$ 0,0	-	20,5 $\pm$ 0,3	22,4 $\pm$ 0,4	22,2 $\pm$ 0,3	23,8 $\pm$ 0,2
Controle runoff	20,7 $\pm$ 0,1	-	20,5 $\pm$ 0,3	22,5 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,4	23,7 $\pm$ 0,2
Kraft runoff	20,7 $\pm$ 0,1	-	20,5 $\pm$ 0,2	22,6 $\pm$ 0,2	21,8 $\pm$ 0,1	23,6 $\pm$ 0,1
Score runoff	20,7 $\pm$ 0,1	-	20,6 $\pm$ 0,3	22,8 $\pm$ 0,5	21,9 $\pm$ 0,3	23,6 $\pm$ 0,2
K + S runoff	20,7 $\pm$ 0,1	-	20,5 $\pm$ 0,3	22,8 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,3	23,5 $\pm$ 0,1
Kraft spray	20,7 $\pm$ 0,1	-	20,5 $\pm$ 0,3	22,7 $\pm$ 0,3	22,1 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1
Score spray	20,7 $\pm$ 0,1	-	20,6 $\pm$ 0,2	22,9 $\pm$ 4,3	22,1 $\pm$ 0,2	23,8 $\pm$ 0,1
K + S spray	20,6 $\pm$ 0,0	-	20,6 $\pm$ 0,3	23,0 $\pm$ 0,2	22,2 $\pm$ 0,3	23,7 $\pm$ 0,1

Tabela C. 11 - Médias $\pm$ desvio padrão das medidas de temperatura medida no período da tarde

Temperatura °C (tarde)	19/03/2015 Semana anterior à contaminação	23/03/2015 Introdução dos peixes	25/03/2015 Dia anterior à contaminação	26/03/2015 Contaminação	27/03/2015 Dia após à contaminação	30/03/2015 Retirada dos peixes
Controle	22,6 $\pm$ 0,1	26,9 $\pm$ 0,7	28,9 $\pm$ 0,8	28,1 $\pm$ 0,5	29,8 $\pm$ 0,5	24,9 $\pm$ 0,2
Controle runoff	22,6 $\pm$ 0,1	27,0 $\pm$ 0,7	29,2 $\pm$ 0,3	26,5 $\pm$ 0,7	29,3 $\pm$ 0,2	24,7 $\pm$ 0,3
Kraft runoff	22,8 $\pm$ 0,1	27,5 $\pm$ 0,5	29,3 $\pm$ 0,5	27,4 $\pm$ 0,8	28,9 $\pm$ 1,4	24,7 $\pm$ 0,1
Score runoff	22,6 $\pm$ 0,3	27,3 $\pm$ 0,6	29,5 $\pm$ 0,5	26,7 $\pm$ 0,5	29,7 $\pm$ 0,5	24,6 $\pm$ 0,1
K + S runoff	22,7 $\pm$ 0,1	26,9 $\pm$ 0,7	29,3 $\pm$ 0,5	26,8 $\pm$ 0,0	29,6 $\pm$ 0,5	24,4 $\pm$ 0,2
Kraft spray	22,7 $\pm$ 0,2	26,9 $\pm$ 0,4	28,9 $\pm$ 0,7	28,4 $\pm$ 1,1	30,0 $\pm$ 0,4	24,8 $\pm$ 0,3
Score spray	22,6 $\pm$ 0,1	27,0 $\pm$ 0,2	29,2 $\pm$ 0,6	28,4 $\pm$ 0,3	30,0 $\pm$ 0,2	24,9 $\pm$ 0,1
K + S spray	22,7 $\pm$ 0,2	26,9 $\pm$ 0,7	29,6 $\pm$ 0,5	29,1 $\pm$ 0,4	30,2 $\pm$ 0,2	25,0 $\pm$ 0,1

Tabela C. 12 - Médias $\pm$ desvio padrão das medidas de amônia durante a contaminação dos mesocosmos

Amônia µg/L	19/03/2015 Semana anterior à contaminação	23/03/2015 Introdução dos peixes	25/03/2015 Dia anterior à contaminação	26/03/2015 Contaminação	27/03/2015 Dia após à contaminação	30/03/2015 Retirada dos peixes
Controle	362,09 $\pm$ 265,58	143,98 $\pm$ 40,72	5,10 $\pm$ 3,75	6,36 $\pm$ 4,49	10,33 $\pm$ 5,15	88,74 $\pm$ 50,67
Controle runoff	74,31 $\pm$ 53,72	489,51 $\pm$ 523,70	5,18 $\pm$ 1,20	14,99 $\pm$ 3,89	11,32 $\pm$ 5,18	69,28 $\pm$ 24,04
Kraft runoff	31,06 $\pm$ 11,96	126,64 $\pm$ 29,38	5,25 $\pm$ 1,57	16,64 $\pm$ 5,13	12,37 $\pm$ 3,98	89,12 $\pm$ 43,17
Score runoff	87,49 $\pm$ 73,87	195,65 $\pm$ 42,32	6,01 $\pm$ 4,32	12,51 $\pm$ 4,18	63,89 $\pm$ 93,23	91,35 $\pm$ 60,91
K + S runoff	52,84 $\pm$ 26,09	189,44 $\pm$ 97,60	23,83 $\pm$ 18,25	151,24 $\pm$ 61,06	19,87 $\pm$ 7,89	92,91 $\pm$ 34,57
Kraft spray	29,75 $\pm$ 2,83	130,90 $\pm$ 42,32	29,69 $\pm$ 34,40	6,03 $\pm$ 3,96	8,91 $\pm$ 6,16	86,34 $\pm$ 38,04
Score spray	25,79 $\pm$ 18,02	157,02 $\pm$ 42,31	18,42 $\pm$ 4,68	12,03 $\pm$ 9,56	5,09 $\pm$ 1,81	311,98 $\pm$ 380,06
K + S spray	75,99 $\pm$ 106,09	137,16 $\pm$ 15,71	18,00 $\pm$ 5,07	5,00 $\pm$ 2,37	14,68 $\pm$ 5,45	454,19 $\pm$ 332,82

Tabela C. 13 - Médias $\pm$ desvio padrão das medidas de material em suspensão, alcalinidade, turbidez e clorofila α , no dia da contaminação dos mesocosmos

26/03/2015 Contaminação	Material em suspensão total	Alcalinidade	Turbidez	Clorofila α
Controle	-0,11 $\pm$ 1,36	3,14 $\pm$ 0,40	4,50 $\pm$ 1,50	63,21 $\pm$ 70,15
Controle runoff	60,05 $\pm$ 24,56	2,79 $\pm$ 0,29	98,75 $\pm$ 16,72	255,74 $\pm$ 305,02
Kraft runoff	98,53 $\pm$ 20,72	2,59 $\pm$ 0,25	166,67 $\pm$ 26,25	166,67 $\pm$ 47,62
Score runoff	88,77 $\pm$ 30,72	2,59 $\pm$ 0,50	151,67 $\pm$ 16,50	394,64 $\pm$ 255,36
K + S runoff	318,33 $\pm$ 75,55	2,86 $\pm$ 0,21	346,67 $\pm$ 41,90	273,95 $\pm$ 120,58
Kraft spray	0,92 $\pm$ 1,33	2,96 $\pm$ 0,41	4,67 $\pm$ 0,94	245,21 $\pm$ 114,69
Score spray	11,56 $\pm$ 8,78	3,17 $\pm$ 0,46	11,00 $\pm$ 4,24	452,11 $\pm$ 256,22
K + S spray	5,69 $\pm$ 5,49	3,01 $\pm$ 0,20	5,67 $\pm$ 1,70	183,91 $\pm$ 67,68

Tabela C. 14 - Médias $\pm$ desvio padrão das medidas de nitrito (NO₂ em µg L⁻¹), nitrato (NO₃ em µg L⁻¹), nitrogênio orgânico total (NT em mg L⁻¹), fosfato inorgânico (POI em µg L⁻¹), fósforo total (PT em µg L⁻¹) e silicato (SIO₂ em mg L⁻¹), no dia da contaminação dos mesocosmos

	NO ₂ (µg L ⁻¹)	NO ₃ (µg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	POI (µg L ⁻¹)	PT (µg L ⁻¹)	SIO ₂ (mg L ⁻¹)
Controle	1,34 $\pm$ 0,23	13,71 $\pm$ 2,27	0,45 $\pm$ 0,06	1,25 $\pm$ 0,61	18,72 $\pm$ 6,47	0,77 $\pm$ 0,51
Controle runoff	5,16 $\pm$ 0,74	25,04 $\pm$ 3,22	0,64 $\pm$ 0,20	7,46 $\pm$ 0,90	128,60 $\pm$ 58,12	1,26 $\pm$ 0,10
Kraft runoff	6,61 $\pm$ 0,60	26,05 $\pm$ 3,96	0,87 $\pm$ 0,15	9,60 $\pm$ 2,10	201,29 $\pm$ 31,19	0,77 $\pm$ 0,29
Score runoff	7,82 $\pm$ 0,93	21,95 $\pm$ 1,98	0,70 $\pm$ 0,11	13,21 $\pm$ 3,56	190,05 $\pm$ 25,25	1,19 $\pm$ 0,42
K + S runoff	9,82 $\pm$ 1,70	142,66 $\pm$ 101,5	0,50 $\pm$ 0,06	16,89 $\pm$ 2,07	280,01 $\pm$ 44,83	2,32 $\pm$ 0,20
Kraft spray	1,75 $\pm$ 0,52	10,80 $\pm$ 0,66	0,37 $\pm$ 0,11	0,80 $\pm$ 0,49	32,04 $\pm$ 2,24	2,29 $\pm$ 0,26
Score spray	1,62 $\pm$ 0,28	20,15 $\pm$ 14,41	0,78 $\pm$ 0,25	2,12 $\pm$ 0,09	60,26 $\pm$ 26,19	1,95 $\pm$ 0,75
K + S spray	1,70 $\pm$ 0,38	12,22 $\pm$ 0,47	0,51 $\pm$ 0,00	1,52 $\pm$ 0,58	31,87 $\pm$ 5,67	1,58 $\pm$ 0,33

REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes**, 2016.

HANSEN, H. P.; KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSHOF, K.; KREMLING, K.; EHRHARDT, M. (Eds.). . **Methods of Seawater Analysis**. Third, Com ed. [s.l.] WILEY-VCH Verlag GmbH, 1999. p. 159–228.

NOVELLI, A. et al. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 36–40, 2012.

NOVELLI, A. et al. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec®18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1408–1414, 2016.

VANDERLEI, M. R. **Efeitos dos agrotóxicos Kraft®36EC e Score®250EC (e seus princípios ativos) em ecossistemas aquáticos: análises comparativas e ecossistêmicas.** (Dissertação de Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

**APÊNDICE D – Análises químicas da abamectina e do difenoconazol nas matrizes de
água e sedimento**

Validação dos métodos de quantificação química da abamectina e do difenoconazol nas matrizes de água e solo por HPLC/MS/MS

As análises químicas foram realizadas no laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA/USP - Piracicaba, SP, com orientação do Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo. Foram padronizados métodos de processamento das matrizes ambientais de água e sedimento para a determinação dos praguicidas abamectina e do difenoconazol.

Para a água, tanto no método da abamectina como no do difenoconazol, as amostras foram coletadas em frasco de vidro âmbar e armazenadas na geladeira até serem transportadas ao CENA. As amostras foram então filtradas em seringas de 5 mL e filtro de membrana politetrafluoretileno hidrofóbico (PTFE) 0,2 µm (Agilent) e colocadas em vial para serem levadas ao equipamento de leitura.

Para a determinação da abamectina no solo foram coletadas 5 g de amostras peneiradas e liofilizadas em tubos de teflon de 50 mL e foram adicionados 20 mL de acetato de etila (HPLC). A solução foi agitada em vórtex por 10 minutos e levada para a centrífuga a 4000 x g por 4 minutos para separação do sobrenadante. O procedimento foi repetido adicionando mais 20 mL de acetato de etila, agitando e centrifugando novamente a solução, obtendo no total 40 mL de líquido sobrenadante. Este líquido foi concentrado em rotaevaporador a 45 °C até secar por completo. Foi adicionado então 1 mL de metanol e após agitação e ressuspensão dos resíduos de abamectina em solução de metanol, as amostras foram filtradas em PTFE 0,2 µm (Agilent) e colocadas em vial para serem levadas ao equipamento de leitura (adaptado de DIONISIO; RATH, 2016).

Para a determinação do difenoconazol foram coletadas 10 g de amostras peneiradas e liofilizadas em tubos de teflon de 50 mL. Foram adicionados 2 mL de água MiliQ e 20 mL de acetonitrila (HPLC).

A solução foi agitada em vórtex por 5 minutos e foram adicionados 2 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl. Após agitação em vórtex por mais 5 minutos a solução foi centrifugada a 4000 x g por 4 minutos para a separação do sobrenadante, o qual foi filtrado em PTFE 0,2 µm (Agilent) e colocado em vial para ser levado ao equipamento de leitura (adaptado de DONG et al., 2013).

Depois de realizado os diferentes métodos de extração dos analitos, as amostras foram injetadas no HPLC/MS/MS da Agilent® 6490 series. A Figura 1 mostra o tipo de equipamento utilizado no CENA para a quantificação dos compostos.

Figura D. 1 – Equipamento HPLC/MS/MS Agilent® 6490 series utilizado nas quantificações da abamectina e difenoconazol nas amostras de água e sedimento

Fonte: Adaptado de AGILENT, 2018.

Trata-se de um equipamento composto por um cromatógrafo (HPLC) em que a coluna analítica foi utilizada com a função de separar os compostos principalmente pela diferença de polaridade e peso molecular. Acoplado ao cromatógrafo seguem dois detectores de massas do tipo quadrupolo, sendo que o primeiro triplo quadrupolo, por diferença de voltagem, seleciona e separa o íon precursor escolhido do resto das moléculas pela razão massa/carga (m/z) em ressonância com o campo aplicado. Os íons não selecionados são eliminados por uma bomba de vácuo, enquanto que o íon precursor passa por ionização do tipo *eletro spray* (ESI) e o segundo triplo quadrupolo seleciona e detecta o íon produto específico. O detector manda então o sinal para o computador e por meio de um software é possível quantificar os íons selecionados (AGILENT, 2018; LANÇAS, 2009). As condições analíticas otimizadas para cada composto estão descritas na Tabela 1.

Tabela D. 1 - Descrição dos métodos de determinação da abamectina e do difenoconazol otimizados para o equipamento HPLC/MS/MS Tecnologia Agilent

	Abamectina	Difenoconazol
Tipo de Ionização	ESI/MRM	ESI/MRM
Coluna analítica	Zorbax Eclipse plus C18 - Agilent 2,1 x 150 mm; 3,5 μ m	Zorbax SB – C18 – Agilent 2,1 x 50 mm, 1,8 μ m
Íon precursor	895,4/895,4	406,1
Íon produto quantitativo/qualitativo	449,3/751,1	250,9/188,0
Temperatura do Gás	300°C	350°C
Volume de injeção	10 μ L	20 μ L
Tempo de corrida	5 min	3 min
Fluxo da bomba	0,4 mL/min	0,4 mL/min
Tempo de retenção	2,9 min	1,2 min
Fase móvel A	Acetonitrila+0,1% Ác. Fórmico 90%	Acetonitrila+0,1% Ác. Fórmico 70%
Fase móvel B	Água + 0,1% Ác. Fórmico 10%	Água + 0,1% Ác. Fórmico 30%

Após a realização de inúmeros testes seguindo as recomendações do DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2003), a validação dos métodos de quantificação dos compostos foi obtida utilizando uma Planilha de Validação elaborada e disponibilizada online (RIBEIRO; FERREIRA, 2008). Os métodos de determinação química da abamectina e do difenoconazol mostraram-se sensíveis e específicos, pois produziram resposta a somente um analito específico. A Figura 2 mostra os picos dos íons quantificadores e qualificadores dos dois métodos.

Figura D. 2 - Picos analíticos dos íons quantificadores e qualificadores, respectivamente, dos compostos abamectina (A) e difenoconazol (B)

A linearidade dos métodos foi calculada pela comparação dos resíduos do ajuste linear e do ajuste quadrático, e com 99,9% de confiança o método foi considerado linear na faixa de 1 - 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,9980$) para a abamectina e de 1 - 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,9992$) para o difenoconazol (Figura 3).

Figura D. 3 - Curvas de calibração dos métodos de determinação dos compostos abamectina (esquerda) e difenoconazol (direita). Com 99,9% de confiança o método foi considerado linear para ambos os métodos

A sensibilidade dos métodos foi calculada baseada nos parâmetros da curva analítica dentro dos limites de precisão e exatidão, sendo o limite de detecção e quantificação de 22,3

$\mu\text{g L}^{-1}$ e $27,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para a abamectina e $22,2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $26,9 \mu\text{g L}^{-1}$ para o difenoconazol, respectivamente, com 99 % confiança.

A precisão foi estimada baseando-se no desvio padrão relativo (DPR), ou coeficiente de variação (CV), e calculada a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio. A precisão foi calculada a partir de dados de repetitividade (recomendações do INMETRO – sete replicatas de amostras intermediárias da curva realizadas no mesmo laboratório, no mesmo dia e pelo mesmo analista). O limite de DPR aceito para agrotóxicos deve ser menor que 20% (JUNIOR et al., 2001). Com isso, os métodos foram considerados precisos, pois os DPR encontrados tanto para a abamectina (Tabela 2) quanto para o difenoconazol (Tabela 3) estavam dentro dos limites permitidos.

A exatidão mede a proximidade do valor medido com o valor de referência considerado verdadeiro e relaciona-se com o erro absoluto de uma medida. O cálculo da exatidão foi baseado na diferença entre o valor predito (medido no equipamento) e o valor referência (real). Os métodos de quantificação da abamectina e difenoconazol foram considerados exatos (Tabelas 2 e 3), pois apresentaram valores próximos ao desejável (% de exatidão desejável = 0) (JUNIOR et al., 2001).

Tabela D. 2 – Dados de repetibilidade para calcular a precisão dos métodos de determinação da abamectina, a partir dos valores de DPR, e avaliação da exatidão. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$

Precisão Intermediária Abamectina				
Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Resíduo Absoluto	Exatidão (%)
1	41,8868	50,0000	-8,1132	-16,2264
2	46,4519	50,0000	-3,5481	-7,0962
3	44,7570	50,0000	-5,2430	-10,4859
4	46,8717	50,0000	-3,1283	-6,2566
5	42,8417	50,0000	-7,1583	-14,3166
6	45,7824	50,0000	-4,2176	-8,4351
7	37,9732	50,0000	-12,0268	-24,0535
Média	43,7950			
DP	3,16			
DPR (%)	7,21			
1	92,1638	100,0000	-7,8362	-7,8362
2	98,3265	100,0000	-1,6735	-1,6735
3	95,6894	100,0000	-4,3106	-4,3106
4	93,8645	100,0000	-6,1355	-6,1355
5	96,4087	100,0000	-3,5913	-3,5913
6	98,7914	100,0000	-1,2086	-1,2086
7	96,5094	100,0000	-3,4906	-3,4906
Média	95,9648			
DP	2,35			
DPR (%)	2,44			
1	138,7560	125,0000	13,7560	11,0048
2	137,7296	125,0000	12,7296	10,1837
3	132,9273	125,0000	7,9273	6,3418
4	133,2950	125,0000	8,2950	6,6360
5	130,7018	125,0000	5,7018	4,5614
6	128,0911	125,0000	3,0911	2,4729
7	125,9527	125,0000	0,9527	0,7622
Média	132,4934			
DP	4,71			
DPR (%)	3,55			

Tabela D. 3 – Dados de repetibilidade para calcular a precisão dos métodos de determinação do difenoconazol, a partir dos valores de DPR, e avaliação da exatidão. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$

Precisão Intermediária Difenoconazol				
Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Resíduo Absoluto	Exatidão (%)
1	46,2821	50,0000	-3,7179	-7,4357
2	45,9958	50,0000	-4,0042	-8,0083
3	45,2720	50,0000	-4,7280	-9,4560
4	45,2683	50,0000	-4,7317	-9,4635
5	44,7595	50,0000	-5,2405	-10,4809
6	44,4574	50,0000	-5,5426	-11,0853
7	50,1206	50,0000	0,1206	0,2413
Média	46,0223			
DP	1,92			
DPR (%)	4,16			
1	102,9467	100,0000	2,9467	2,9467
2	102,5325	100,0000	2,5325	2,5325
3	103,2051	100,0000	3,2051	3,2051
4	105,6052	100,0000	5,6052	5,6052
5	105,4076	100,0000	5,4076	5,4076
6	100,5244	100,0000	0,5244	0,5244
7	101,1387	100,0000	1,1387	1,1387
Média	103,0515			
DP	1,93			
DPR (%)	1,88			
1	146,7311	150,0000	-3,2689	-2,1792
2	143,6165	150,0000	-6,3835	-4,2557
3	146,3265	150,0000	-3,6735	-2,4490
4	142,9916	150,0000	-7,0084	-4,6722
5	144,9364	150,0000	-5,0636	-3,3757
6	144,9365	150,0000	-5,0635	-3,3757
7	144,1986	150,0000	-5,8014	-3,8676
Média	144,8196			
DP	1,36			
DPR (%)	0,94			

A robustez dos métodos foi estimada variando-se as matrizes. Os métodos foram desenvolvidos para análise de água e solo. Os valores foram estimados em três níveis de concentração, um para valores de concentração na primeira metade da curva de calibração, outro na região intermediária e outro na segunda metade, sempre em triplicata (INMETRO, 2003). Os valores de DPR também não excederam os limites permitidos (<20%) em nenhuma das condições testadas, sendo portando considerado um método robusto (Tabelas 4 e 5).

Quantificação das amostras

Após a validação dos métodos foram realizados os ensaios ecotoxicológicos nas quais amostras de água e sedimento foram coletadas no início e no fim dos experimentos para quantificação da abamectina e difenoconazol. Devido a problemas técnicos com o equipamento (detector de massas), não foi possível detectar as concentrações reais dos compostos durante os experimentos. No entanto, os resultados de confirmação dos valores nominais das concentrações dos compostos nas caldas utilizadas nos experimentos de mesocosmos e bioensaios foram quantificados previamente. A recuperação dos analitos foi

estimada pelas análises de amostras adicionadas com quantidades conhecidas dos compostos, e a taxa de recuperação foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = (C1 - C2 / C3) \times 100$$

Onde: C1 = concentração determinada na amostra adicionada, C2 = concentração determinada na amostra não adicionada, C3 = concentração adicionada.

As médias das taxas de recuperação obtidas podem ser observadas nas Tabelas 6 e 7. A recuperação média para a abamectina foi de 87,2 % $\pm$ 11,03 na calda e 104,1 % $\pm$ 22,04 no sedimento. Para o difenoconazol, a recuperação média foi de 142,7 % $\pm$ 3,49 na calda e 103,8 % $\pm$ 14,17 no sedimento.

Os métodos de determinação química da abamectina e difenoconazol foram validados e a confirmação das concentrações nominais presentes nas caldas das formulações comerciais de Kraft 36 EC® e Score 250 EC® tiveram recuperações satisfatórias. Porém, não foi possível determinar as concentrações reais da abamectina e do difenoconazol durante os experimentos devido à manutenção do equipamento.

Tabela D. 4 – Dados para a análise da robustez dos métodos de determinação da abamectina a partir dos valores de DPR variando-se as matrizes água e sedimento. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$

Condição A - Matriz água					Condição B - Matriz sedimento				
Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Resíduo Absoluto	Exatidão (%)	Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Resíduo Absoluto	Exatidão (%)
1	21,0213	20,0000	1,0213	5,1064	1	28,5597	30,0000	-1,4403	-4,8008
2	20,2858	20,0000	0,2858	1,4290	2	29,7298	30,0000	-0,2702	-0,9007
3	20,3983	20,0000	0,3983	1,9913	3	31,7699	30,0000	1,7699	5,8998
Média	20,5684				Média	30,0198			
DP	0,40				DP	1,62			
DPR (%)	1,93				DPR (%)	5,41			
1	31,9289	30,0000	1,9289	6,4298	1	53,7430	50,0000	3,7430	7,4859
2	31,0927	30,0000	1,0927	3,6422	2	46,0816	50,0000	-3,9184	-7,8368
3	33,4745	30,0000	3,4745	11,5817	3	47,1075	50,0000	-2,8925	-5,7850
Média	32,1654				Média	48,9774			
DP	1,21				DP	4,16			
DPR (%)	3,76				DPR (%)	8,49			
1	49,2019	50,0000	-0,7981	-1,5963	1	74,7986	75,0000	-0,2014	-0,2685
2	47,8008	50,0000	-2,1992	-4,3984	2	77,6775	75,0000	2,6775	3,5700
3	48,5865	50,0000	-1,4135	-2,8271	3	80,7220	75,0000	5,7220	7,6293
Média	48,5297				Média	77,7327			
DP	0,70				DP	2,96			
DPR (%)	1,45				DPR (%)	3,81			

Tabela D. 5 – Dados para a análise da robustez dos métodos de determinação do difenoconazol a partir dos valores de DPR variando-se as matrizes água e sedimento. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$

Condição A - Matriz água					Condição B - Matriz sedimento				
Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Resíduo Absoluto	Exatidão (%)	Amostra	Concentração Predita	Concentração Referência	Resíduo Absoluto	Exatidão (%)
1	10,4208	10,0000	0,4208	4,2082	1	11,7021	10,0000	1,7021	17,0209
2	9,8892	10,0000	-0,1108	-1,1082	2	11,3150	10,0000	1,3150	13,1499
3	9,9296	10,0000	-0,0704	-0,7042	3	11,3088	10,0000	1,3088	13,0881
Média	10,0799				Média	11,4420			
DP	0,30				DP	0,23			
DPR (%)	2,94				DPR (%)	1,97			
1	50,5052	50,0000	0,5052	1,0104	1	50,0126	50,0000	0,0126	0,0251
2	53,8362	50,0000	3,8362	7,6724	2	51,5367	50,0000	1,5367	3,0733
3	53,7061	50,0000	3,7061	7,4122	3	48,8565	50,0000	-1,1435	-2,2870
Média	52,6825				Média	50,1353			
DP	1,89				DP	1,34			
DPR (%)	3,58				DPR (%)	2,68			
1	100,6852	100,0000	0,6852	0,6852	1	100,2444	100,0000	0,2444	0,2444
2	101,5156	100,0000	1,5156	1,5156	2	96,9732	100,0000	-3,0268	-3,0268
3	93,7407	100,0000	-6,2593	-6,2593	3	104,7969	100,0000	4,7969	4,7969
Média	98,6472				Média	100,6715			
DP	4,27				DP	3,93			
DPR (%)	4,33				DPR (%)	3,90			

Tabela D. 6 – Concentrações quantificadas de abamectina na calda de Kraft 36 EC® e no sedimento. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$

Amostra	Quantificação abamectina			
	Concentração Predita	Concentração Referência	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
Abamectina na calda	84,24	108	70,17	$87,7 \pm 11,03$
	89,43	108	74,98	
	107,64	108	91,84	
	140,58	130	101,64	
	125,63	130	90,14	
	131,26	130	94,47	
Abamectina no sedimento	713,50	500	141,01	$104,08 \pm 22,04$
	684,16	500	135,14	
	676,63	500	133,63	
	670,57	500	132,42	
	670,23	500	132,35	
	679,12	500	134,13	
	21486,48	25000	85,91	
	21458,81	25000	85,80	
	21445,37	25000	85,75	
	22279,51	25000	89,08	
	21581,95	25000	86,29	
	21579,86	25000	86,28	
	32991,06	40000	82,46	
	35266,12	40000	88,14	
	35545,46	40000	88,84	
	38175,50	40000	95,42	
	38420,98	40000	96,03	
	37952,62	40000	94,86	

Tabela D. 7 – Concentrações quantificadas de difenoconazol na calda de Score 250 EC® e no sedimento. As concentrações estão em $\mu\text{g L}^{-1}$

Amostra	Quantificação difenoconazol			
	Concentração Predita	Concentração Referência	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
Difenoconazol na calda	153,38	105,2	145,80	$142,7 \pm 3,49$
	153,10	105,2	145,53	
	154,58	105,2	146,94	
	280,59	200	140,29	
	279,83	200	139,91	
	275,65	200	137,82	
Difenoconazol no sedimento	709,54	700	101,37	$103,8 \pm 14,17$
	730,84	700	104,40	
	724,20	700	103,46	
	716,769	700	102,39	
	722,21	700	103,17	
	758,31	700	108,33	
	12213,41	10000	122,13	
	12512,28	10000	125,12	
	11928,05	10000	119,28	
	12080,52	10000	120,80	
	11722,41	10000	117,22	
	12101,95	10000	121,02	
	18042,03	20000	90,21	
	17027,37	20000	85,13	
	17743,57	20000	88,72	
	16875,42	20000	84,38	
	17153,40	20000	85,77	
	17146,13	20000	85,73	

REFERÊNCIAS

- AGILENT. **Agilent's LC/MS systems**. Disponível em: <<https://www.agilent.com>>. Acesso em: 13 abr. 2018.
- DIONISIO, A. C.; RATH, S. Abamectin in soils: Analytical methods, kinetics, sorption and dissipation. **Chemosphere**, v. 151, p. 17–29, 2016.
- DONG, F. et al. Chiral triazole fungicide difenoconazole: Absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 7, p. 3386–3394, 2013.
- INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**, Brasil, 2003.
- JUNIOR, O. P. D. A. et al. Validação de Métodos Analíticos: uma breve revisão. **Revista Cadernos de Pesquisa**, v. 12, p. 116–131, 2001.
- LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.
- MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58–66, 2017.
- MU, X. et al. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 147–157, 2013.
- RIBEIRO, F. A. DE L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.
- SANCHES, A. L. M. et al. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, p. 582–587, 2017.
- SILVA, M. R. **Gestão de embalagens de agrotóxicos - logística reversa em pequenos municípios brasileiros: o caso do município de Bom Repouso, MG**. (Dissertação de mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

ANEXO – Aprovação da comissão de ética

CENTRO DE ENGENHARIA
APLICADA À SAÚDE EESC - USP

COMISSÃO DE ÉTICA EM UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

São Carlos, 28 de abril de 2017.

Prezada Pesquisadora

Temos a grata satisfação de comunicar que a Comissão de Ética em Utilização de Animais da EESC-USP, analisou e apreciou o parecer do Revisor referente ao projeto de pesquisa "Análise do efeito ambiental dos praguicidas *Kraft 36 EC*® e *Score 250 EC*® e de seus princípios ativos abamectina e difenoconazol em águas superficiais tropicais por meio de biomarcadores", apresentado por V. Sa., considerando o projeto adequado e aprovado para execução.

Sem mais para o momento, desejamos sucesso na realização do projeto.

Atenciosamente,

Orivaldo Lopes da Silva
Presidente
CEUA-EESC-USP

Ilma. Sra.
Ana Leticia Madeira Sanches
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental
EESC-USP