



Faculdade de Farmácia  
Universidade de Coimbra

**Estudo de Pesticidas com Características  
de Desregulação Endócrina Quantificados na  
Albufeira do Alqueva**

Patrícia Alexandra Dias Brito Palma

2009









Faculdade de Farmácia  
Universidade de Coimbra

**Estudo de Pesticidas com Características  
de Desregulação Endócrina Quantificados na  
Albufeira do Alqueva**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de  
Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários para a obtenção do  
Grau de Doutor em Toxicologia

Patrícia Alexandra Dias Brito Palma

2009



*Aos meus Pais e Irmão Hugo*



*Ao meu Marido e ao meu Filho Francisco*



## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e o apoio de algumas pessoas, às quais gostaria de agradecer.

À Prof. Doutora Isabel Rita Barbosa como minha orientadora neste estudo, pelas sugestões, críticas e revisões desta dissertação. Pelos seus conselhos e principalmente pelo seu apoio em momentos cruciais, do desenvolvimento deste trabalho, o meu obrigado.

À Prof. Doutora Rosa Maria Fernandes, por ter aceitado ser minha co-orientadora, pelas sugestões e revisões desta dissertação, pela disponibilidade e apoio que sempre demonstrou para comigo.

Ao Prof. Doutor Amadeu Soares, por ter aceitado ser meu co-orientador. O meu agradecimento pelo seu espírito de abertura que manifestou desde o início quando me acolheu no seu Laboratório.

À Miren Lopez de Alda, do Departamento de Química Ambiental IIQAB-CSIC, Barcelona, o meu agradecimento pela sua preciosa ajuda na avaliação dos pesticidas.

Ao Andreas Bohn, do Instituto Gulbenkian, pelo seu apoio e ensinamentos no âmbito da análise estatística desta dissertação.

À minha amiga e colega Paula Alvarenga, um agradecimento muito especial, pela sua paciência, apoio, ensinamentos, conversas e por sempre me ter feito acreditar que era possível.

À Vera e à Cláudia, obrigado por tudo, sem o seu apoio, compreensão e alegria teria sido tudo muito mais difícil.

À Adelaide e à Anabela pela ajuda e atenção que me prestaram sempre que eu dela precisei.

Ao António Serafim da Universidade de Évora, pela ajuda, pelas saídas de campo e pelas longas conversas sobre a Albufeira do Alqueva.

À Graça por todas as conversas de apoio e pela ajuda na correcção do texto. Muito obrigado por tudo.

À Isabel, à Zézinha, à Ivone, à Mariana e à D. Angelina por todo o apoio concedido no laboratório de águas.

À EDIA por ter mostrado interesse no presente trabalho de investigação e por ter apoiado as saídas de campo à albufeira.

Aos meus Pais, pelos ensinamentos, por terem sempre acreditado e pelo orgulho demonstrado em todos estes anos.

Ao meu irmão Hugo, pelo grande companherismo e amizade que nos une e pela força que me dá todos os dias.

Ao meu marido Francisco pelo apoio, ajuda e por todos os momentos de força e dedicação. Sem a sua ajuda nada disto teria sido possível.

Por último ao meu filho Francisco simplesmente por existir!

**DIRECTIVA QUADRO DA ÁGUA,**

Directiva 2000/60/CE de 23 de Outubro de 2000

(...)

(44) A identificação de substâncias perigosas deve ter em conta o princípio da precaução, e em especial a identificação de efeitos potencialmente negativos decorrentes do produto, bem como uma avaliação científica do risco.

(...)



O desenvolvimento deste trabalho deu origem à publicação de artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

**Palma, P.**, Palma, V.L., Matos, C., Fernandes, R.M., Bohn, A., Soares, A.M.V.M., Barbosa, I.R. 2009. Assessment of the pesticides atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos for juvenoid-related endocrine activity using *Daphnia magna*. **Chemosphere**.(aceite para publicação).

**Palma, P.**, Alvarenga, P., Palma, V., Matos, C., Fernandes, R.M., Soares, A.M.V.M., Barbosa, I.R. 2009. Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: A case study of the Alqueva Reservoir (Portugal). **Environmental Science and Pollution Research**. DOI 10.1007/s11356-009-0143-3.

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

**Palma, P.**, Palma, V.L., Fernandes, R.M., Soares, A.M.V.M., Barbosa, I.R. 2009. Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 72: 344-350.

**Palma, P.**, Kuster, M., Alvarenga, P., Palma, V.L., Fernandes, R.M., Soares, A.M.V.M., López de Alda, M.J., Barceló, D., Barbosa, I.R. 2009. Risk assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (South of Portugal) using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Environment International**. 35: 545-551.

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

## RESUMO

Um dos objectivos propostos até 2015 pela Directiva-Quadro da Água é atingir o "bom potencial ecológico" de todas as águas superficiais fortemente modificadas. Para isso é necessária a caracterização da qualidade das águas superficiais e dos seus riscos ambientais e, em seguida, implementar processos de gestão dos riscos e reabilitação dos ecossistemas em estudo. Os programas de qualidade das águas superficiais devem ter em conta não só as características físico-químicas e microbiológicas, que integram a primeira fase da avaliação da qualidade da água, mas também ser complementados por ensaios de avaliação toxicológica, que determinam potenciais efeitos tóxicos e permitem uma avaliação integrada da qualidade da massa água e dos seus efeitos nas populações e nas comunidades do ecossistema aquático.

A avaliação da qualidade das águas de superfície, utilizando uma abordagem ecotoxicológica foi preconizada na albufeira do Alqueva. A albufeira do Alqueva, está integrada na Bacia Hidrográfica do Rio Guadiana (Sul de Portugal) poluída por pesticidas provenientes de actividades agrícolas intensivas. Este facto justifica a avaliação da dinâmica dos principais pesticidas detectados na massa de água, para posterior análise do possível impacto dos seus riscos no ecossistema aquático e na saúde humana.

Os principais parâmetros responsáveis pela variabilidade da qualidade da água da albufeira foram a matéria orgânica, os nutrientes, os herbicidas e os parâmetros microbiológicos. Além disso, a abordagem ecotoxicológica demonstrou que várias amostras eram potencialmente tóxicas. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que o *Vibrio fischeri* e o *Thamnocephalus platyurus* são duas das espécies que devem integrar a avaliação ecotoxicológica aguda da albufeira. As respostas obtidas no ensaio crónico indicam que algumas das espécies de crustáceos deste ecossistema aquático podem estar em risco, especialmente no período seco.

As principais classes de pesticidas detectadas foram triazinas e fenilureas, nomeadamente, atrazina, simazina, terbutilazina e diurão. Estes herbicidas apresentaram um padrão sazonal relacionado com a sua aplicação nas culturas. Este facto pode indicar que a poluição causada por estes compostos não é persistente. Em contrapartida, alguns pesticidas, como endossulfão sulfato, diazinão, metolaclo e linurão, foram detectados em baixas concentrações durante períodos prolongados, o que indica que estes

pesticidas são susceptíveis de persistir na massa de água e podem ter um potencial impacto no ecossistema aquático. A análise temporal mostrou que, no período húmido, os pesticidas que influenciaram a qualidade da água foram clorpirifos, diurão, isoproturão, clortolurão e no período seco foram terbutilazina, atrazina e simazina.

A integração dos resultados permitiu concluir que os locais com pior qualidade de água estão localizados no troço a montante da albufeira e nas áreas circundantes de intensa actividade agrícola.

Uma das etapas para a avaliação do risco ambiental dos pesticidas é a caracterização do seu perfil toxicológico, que deve incluir a avaliação dos seus possíveis efeitos de desregulação endócrina. O clorpirifos, o endossulfão sulfato e a atrazina foram seleccionados tendo em consideração a sua utilização, a concentração na Bacia Hidrográfica do Rio Guadiana e o seu significado ambiental.

Os resultados do estudo ecotoxicológico agudo confirmaram que os insecticidas são mais tóxicos do que os herbicidas para as espécies aquáticas testadas (*V. fischeri*, *T. platyurus* e *Daphnia magna*). No que diz respeito às espécies de crustáceos, os resultados indicaram que o organismo mais sensível aos insecticidas foi o *T. platyurus*. Neste estudo o clorpirifos foi o pesticida que maior toxicidade promoveu nas espécies utilizadas.

Quanto aos resultados do estudo crónico com o crustáceo *D. magna*, todos os pesticidas promoveram a diminuição do número de juvenis viáveis por fêmea e um aumento da percentagem de anomalias embrionárias. Além disso, o endossulfão sulfato induziu um efeito negativo na frequência de mudança de carapaça e no crescimento dos organismos. Apesar de ser o pesticida mais frequentemente detectado e em maiores concentrações, a atrazina não representou um risco toxicológico para o ecossistema em estudo. No entanto, pode promover o aumento de toxicidade de outros compostos em mistura. O clorpirifos foi dos pesticidas avaliados o que promoveu toxicidade aguda e crónica em concentrações similares às quantificadas na albufeira, o que indicia um evidente e actual risco para o ecossistema. Por outro lado, o endossulfão sulfato induziu um efeito crónico marcado e foi o único que apresentou uma acção em ambos os sistemas hormonais (juvenóide e ecdiesteróide) do crustáceo *D. magna*. Apesar das concentrações testadas serem superiores às quantificadas no ecossistema, este composto apresenta factores de bioacumulação e biomagnificação elevados, que em conjunto com o efeito promovido em misturas podem aumentar substancialmente o seu risco ambiental.

## ABSTRACT

One of the goals proposed by the Water Framework Directive is to achieve, until 2015, the "good ecological potential" for all strongly modified surface waters. For this it is necessary to characterize surface water quality and environmental risks and, then, to implement risk management processes and ecosystem rehabilitation. The assessment of surface water quality must take in account not only the physico-chemical and microbiological parameters, which are the first step in water quality assessment, but it must be complemented by toxicity bioassays that determine potential toxic effects and allow an integrated evaluation of the water quality and its effects on populations and on the aquatic ecosystem communities.

The evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach was performed using the Alqueva reservoir as a case study. The Alqueva reservoir is in the catchments of Guadiana River (South of Portugal) and it is impacted by runoff of pesticides from the surrounding intensive agricultural activities, which justify the quantification of the levels of the main pesticides in the water body for further analysis of the possible impact risks on the aquatic ecosystem and human health.

Concerning the water quality assessment, the most relevant parameters responsible for its variability, were organic matter, nutrients, herbicides and microbiological parameters. It was possible to conclude that *Vibrio fischeri* and *Thamnocephalus platyurus* are two species that should be used in the acute bioassays for the ecotoxicological assessment of this reservoir. The chronic responses showed that, especially at the dry season, some of these aquatic ecosystem species might be at risk.

The primary classes of pesticides detected were triazines and phenylureas, namely, atrazine, simazine, terbuthylazine and diuron. These herbicides show a distinct seasonal pattern in surface waters, which may indicate that the pollution of surface water is not persistent. By contrast, some pesticides, such as endosulfan sulphate, diazinon, metolachlor and linuron, were detected at low concentrations for extended periods. This could indicate that these pesticides are likely to persist in surface water and may have a potential risk impact to the aquatic ecosystem. The temporal analysis showed that, in the rainy season, the pesticides that strongly influenced the water quality

status were chlorpyrifos, diuron, isoproturon and chlortoluron and at the dry season were triazines, mainly terbuthylazine, atrazine and simazine.

The integrated results indicated that the sites with impaired water quality were located at the north of the reservoir and in the surrounding areas of intensive agricultural activity.

One of the stages for the environmental risk assessment of pesticides was the evaluation of its toxicological profile, which must include the assessment of their endocrine disruption effects. The endosulfan sulphate, the chlorpyrifos and the atrazine were chosen for the ecotoxicological study taking into account their frequency of use, their concentration in the surface water of Guadiana River, and their environmental significance. Results from the acute ecotoxicological study confirmed that the insecticides were more toxic than herbicides to the aquatic species tested (*V. fischeri*, *T. platyurus* and *Daphnia magna*). The results indicated that the most sensitive organism to the insecticides was *T. platyurus*. This investigation provides evidence that the most toxic pesticide was chlorpyrifos.

Regarding the chronic studies performed with the cladoceran *D. magna*, all featured pesticides decreased the number of viable offspring, and increased the percentage of abnormalities in embryonic development. Furthermore, endosulfan sulphate was the only compound that induced a negative effect in the molting frequency and growth.

Thus, although atrazine is the pesticide most frequently detected at the reservoir, it does not represent a toxicological risk to the ecosystem. However, it may increment the toxicity of other compounds in mixtures. By contrast, chlorpyrifos showed acute and chronic toxicity to the crustacean species at similar concentrations to those measured in the reservoir, indicating a real risk to the ecosystem. Moreover, endosulfan sulphate induced a pronounced chronic effect and it was the only chemical that acted as juvenoid agonist/antagonist and anti-ecdysteroid in the endocrine system of *D. magna*. The concentrations of endosulfan sulphate in surface waters were lower than the concentrations that promoted toxic effects. This may indicate that no ecological hazard exists for the invertebrate species of aquatic ecosystems. However, this compound has a considerable bioaccumulation with high bioconcentration that together with the effect induced by mixtures may increment its environmental risk.

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>PARTE A. AVALIAÇÃO INTEGRADA DA QUALIDADE DA ÁGUA EM ALBUFEIRAS: O CASO DE ESTUDO DA ALBUFEIRA DO ALQUEVA</b>	9
GESTÃO SUSTENTÁVEL DOS RECURSOS HÍDRICOS	11
CARACTERIZAÇÃO DE MASSAS DE ÁGUA DE ALBUFEIRAS	14
POLUIÇÃO E CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS	20
AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO E TOXICIDADE DAS MASSAS DE ÁGUA DE ALBUFEIRAS	27
O CASO DE ESTUDO DA ALBUFEIRA DO ALQUEVA	32
OBJECTIVOS DO ESTUDO	40
<b>CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO INTEGRADA DA QUALIDADE DA ÁGUA DA ALBUFEIRA ALQUEVA: PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS E SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS</b>	41
RESUMO	43
I.1. INTRODUÇÃO	44
I.2. MATERIAL E MÉTODOS	45
I.2.1. Área de Estudo	45
I.2.2. Metodologia de Campo	47
I.2.3. Parâmetros analíticos e metodologias utilizadas	49
I.2.4. Análise Estatística	52
I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
I.4. CONCLUSÕES	79
<b>CAPÍTULO II. CARACTERIZAÇÃO INTEGRADA DA QUALIDADE DA ÁGUA DA ALBUFEIRA DO ALQUEVA: PARÂMETROS ECOTOXICOLÓGICOS</b>	81
RESUMO	83
II.1. INTRODUÇÃO	84
II.2. MATERIAL E MÉTODOS	85
II.2.1. Área de Estudo	85
II.2.2. Parâmetros Analisados	85
II.2.3. Ensaio Ecotoxicológicos	86
II.2.3.1. Meio de Cultura e Cultura de <i>Daphnia magna</i>	86
II.2.3.2. Teste de Inibição de Luminescência com a bactéria <i>V. fischer</i>	88
II.2.3.3. Teste de mortalidade com o crustáceo <i>T. platyurus</i>	89
II.2.3.4. Teste de Inibição de Mobilidade/ Mortalidade com <i>D. magna</i>	90
II.2.3.5. Teste de Reprodução com <i>Daphnia magna</i>	90
II.2.4. Análise Estatística	92
II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
II.4. CONCLUSÕES	104
<b>CAPÍTULO III. AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DOS PESTICIDAS PRIORITÁRIOS E REPRESENTATIVOS DA ALBUFEIRA DO ALQUEVA</b>	105
RESUMO	107
III.1. INTRODUÇÃO	108
III.2. MATERIAL E MÉTODOS	109
III.2.1. Área de Estudo	109
III.2.2. Químicos	110
III.2.3. Procedimento Analítico	110
III.2.4. Análise Estatística	111
III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
III.4. CONCLUSÕES	120

<b>PARTE B. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DAS PROPRIEDADES ENDÓCRINAS DE PESTICIDAS QUANTIFICADOS NA ALBUFEIRA DO ALQUEVA</b>	121
CARACTERÍSTICAS DE PESTICIDAS IDENTIFICADOS NO SISTEMA EM ESTUDO: ATRAZINA, ENDOSSULFÃO SULFATO E CLORPIRIFOS	123
Clorpirifos	124
Endossulfão Sulfato	129
Atrazina	132
DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO ECOSSISTEMA AQUÁTICO	137
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS	141
SISTEMA ENDÓCRINO DOS CRUSTÁCEOS	147
OBJECTIVOS DO ESTUDO	151
<b><u>CAPÍTULO IV. TOXICIDADE AGUDA DA ATRAZINA, DO ENDOSSULFÃO SULFATO E DO CLORPIRIFOS NO <i>VIBRIO FISHERI</i>, <i>THAMNOCEPHALUS PLATYURUS</i> E <i>DAPHNIA MAGNA</i></u></b>	153
RESUMO	155
IV.1. INTRODUÇÃO	156
IV.2. MATERIAL E MÉTODOS	157
IV.2.1. Padrões e Reagentes	157
IV.2.2. Teste de Inibição de Luminescência com a bactéria <i>V. fischeri</i>	158
IV.2.3. Teste de mortalidade com o crustáceo <i>T. platyurus</i>	158
IV.2.4. Teste de Inibição de Mobilidade/ Mortalidade com <i>D. magna</i>	159
IV.2.5. Análise Estatística	159
IV.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	160
IV.4. CONCLUSÕES	163
<b><u>CAPÍTULO V. AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS DE CLORPIRIFOS NA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CRUSTÁCEO <i>DAPHNIA MAGNA</i></u></b>	165
RESUMO	167
V.1. INTRODUÇÃO	168
V.2. MATERIAL E MÉTODOS	169
V.2.1. Padrões e Reagentes	169
V.2.2. Cultura de <i>Daphnia magna</i>	169
V.2.3. Teste de Reprodução: exposição materna ao clorpirifos	170
V.2.4. Exposição de ovos de <i>Daphnia magna</i> ao clorpirifos	171
V.2.5. Análise Estatística	171
V.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	172
V.4. CONCLUSÕES	178
<b><u>CAPÍTULO VI. AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DO ENDOSSULFÃO SULFATO NA REPRODUÇÃO, DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DO CRUSTÁCEO <i>DAPHNIA MAGNA</i></u></b>	179
RESUMO	181
VI.1. INTRODUÇÃO	182
VI.2. MATERIAL E MÉTODOS	183
VI.2.1. Padrões e Reagentes	183
VI.2.2. Cultura de <i>Daphnia magna</i>	183
VI.2.3. Teste de Reprodução: exposição materna ao endossulfão sulfato	184
VI.2.4. Diferenciação sexual	184
VI.2.5. Exposição de ovos de <i>Daphnia magna</i> ao endossulfão sulfato	185
VI.2.6. Análise Estatística	186
VI.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	186
VI.4. CONCLUSÕES	195

<b><u>CAPÍTULO VII. AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DA ATRAZINA NA REPRODUÇÃO, DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DO CRUSTÁCEO <i>DAPHNIA MAGNA</i></u></b>	197
RESUMO	199
VII.1. INTRODUÇÃO	200
VII.2. MATERIAL E MÉTODOS	201
VII.2.1. Padrões e Reagentes	201
VII.2.2. Cultura de <i>Daphnia magna</i>	201
VII.2.3. Teste de Reprodução: exposição materna	202
VII.2.4. Diferenciação sexual	202
VII.2.5. Exposição de ovos de <i>Daphnia magna</i> à atrazina	202
VII.2.6. Análise Estatística	203
VII.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	203
VII.4. CONCLUSÕES	208
<b><u>CAPÍTULO VIII. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE JUVENÓIDE NO SISTEMA ENDÓCRINO DO CRUSTÁCEO <i>DAPHNIA MAGNA</i>, DOS PESTICIDAS ATRAZINA, ENDOSSULFÃO SULFATO E CLORPIRIFOS</u></b>	209
RESUMO	211
VIII.1. INTRODUÇÃO	212
VIII.2. MATERIAL E MÉTODOS	214
VIII.2.1. Padrões e Reagentes	214
VIII.2.2. Teste de Reprodução: actividade agonista no sistema juvenóide	215
VIII.2.3. Teste de Reprodução: actividade anti-jjuvenóide	215
VIII.2.4. Análise Estatística	216
VIII.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	216
VIII.4. CONCLUSÕES	224
<b><u>CAPÍTULO IX. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ECDIESTERÓIDE, NO SISTEMA ENDÓCRINO DO CRUSTÁCEO <i>DAPHNIA MAGNA</i>, DOS PESTICIDAS ATRAZINA E</u></b>	225
RESUMO	227
IX.1. INTRODUÇÃO	228
IX.2. MATERIAL E MÉTODOS	229
IX.2.1. Padrões e Reagentes	229
IX.2.2. Teste de Reprodução	230
IX.2.3. Exposição de ovos de <i>Daphnia magna</i> ao endossulfão sulfato e à	230
IX.2.4. Co-administração de 20-HE	231
IX.2.5. Análise Estatística	231
IX.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	231
IX.4. CONCLUSÕES	238
<b><u>PARTE C. CONCLUSÕES FINAIS</u></b>	239
CONCLUSÕES FINAIS	241
TRABALHOS DE INVESTIGAÇÃO A DESENVOLVER	245
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	247

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura.1.</b> Distribuição da precipitação média anual (adaptado de Cunningham e Cunningham, 2004).	12
<b>Figura 2.</b> Estratificação térmica típica de regiões temperadas nos períodos mais quentes (adaptado de Manahan, 2000).	16
<b>Figura.3.</b> Principais reacções químicas que ocorrem na massa de água (adaptado de Manahan, 2000).	18
<b>Figura.4.</b> Fontes de poluição difusa e pontual, referenciadas na área circundante da albufeira do Alqueva (adaptado Terceiro <i>et al.</i> , 2008)	37
<b>Figura.5.</b> Paredão e caudal ecológico da Barragem de Alqueva (adaptado <a href="http://www.edia.pt/portal/">http://www.edia.pt/portal/</a> , acessido a 4 Fevereiro 2009).	38
<b>Figura.6.</b> Localização da albufeira do Alqueva (adaptado <a href="http://www.edia.pt/portal/">http://www.edia.pt/portal/</a> acessido a 20 Março 2008).	39
<b>Figura.I.1.</b> Localização das estações de amostragem na albufeira do Alqueva (adaptado <a href="http://www.edia.pt/portal/">http://www.edia.pt/portal/</a> acessido a 7 Janeiro 2006).	46
<b>Figura.I.2.</b> Plataforma de Alcarrache na albufeira de Alqueva.	47
<b>Figura.I.3.</b> Material utilizado e recolhido em cada campanha de amostragem, durante o estudo.	48
<b>Figura.I.4.</b> Variação do parâmetro cloretos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão; $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.	58
<b>Figura.I.5.</b> Variação do parâmetro azoto kjeldahl ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão; $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.	59
<b>Figura.I.6.</b> Variação do parâmetro azoto amoniacal ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão; $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.	60
<b>Figura.I.7.</b> Variação do parâmetro nitratos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão; $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.	61
<b>Figura.I.8.</b> Variação do parâmetro nitritos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão; $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.	62
<b>Figura.I.9.</b> Variação do parâmetro fósforo total ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão; $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.	63
<b>Figura.I.10.</b> Variação do parâmetro $\text{CBO}_5$ ( $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ ) (média desvio padrão; $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.	64
<b>Figura.I.11.</b> Variação do parâmetro CQO ( $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ ) (média desvio padrão; $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.	65
<b>Figura.I.12.</b> Variação dos metais totais (Ar, Fe, Mn) ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão; $n=3$ ), no período de estudo.	66
<b>Figura.I.13.</b> Variação dos parâmetros coliformes totais (NMP/mL) e enterococos fecais (ufc/100mL), em cada estação de amostragem, no período de estudo. a) Representa quantidades de coliformes totais superiores a 100	67
<b>Figura.I.14.</b> Variação dos pesticidas (atrazina, simazina, terbutilazina, metolacoloro, clorpirifos e endossulfão sulfato) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (média desvio padrão; $n=3$ ), no período de estudo.	68
<b>Figura.I.15.</b> Projecção das amostras no plano principal formado pelo 1º e 2º varifactores (VF1 e VF2).	75
<b>Figura.I.16.</b> Representação gráfica do tipo <i>Box-and-Wisker</i> referente à projecção das amostras nos dois principais varifactores, tendo em consideração a variabilidade temporal e o local. (a) VF 1 (descritores orgânicos, nutrientes, ferro); (b) VF2 (herbicidas).	77

<b>Figura.I.17.</b> Dendrograma das 81 amostras com base na distância euclidiana, quando projectadas no Plano Principal.	78
<b>Figura.II.1.</b> Cultura de <i>P. subcapitata</i> mantida no laboratório.	88
<b>Figura.II.2.</b> Organismo pertencente à espécie <i>T. platyurus</i>	89
<b>Figura.II.3.</b> Ensaio crónico com <i>D. magna</i> .	91
<b>Figura.II.4.</b> Distribuição espacial e temporal dos parâmetros químicos através da representação do tipo <i>Box-and-Wisker</i> . O VMR e o VMA do Decreto-Lei nº 236/98, MA e a CMA (ECC, 2007) estão representados, sempre que possível, por uma linha a cheio.	95
<b>Figura.II.5.</b> Variação espacial e temporal do número de juvenis produzidos por <i>D. magna</i> , durante 21 dias de exposição as amostras de água ((25, 50, 75, 100% (v/v)). Os resultados são expressos pela (média±desvio padrão, n=20). * Indica uma diferença significativa em relação ao controlo (Teste de	100
<b>Figura.III.1.</b> Variação sazonal dos pesticidas (ng L <sup>-1</sup> ) atrazina, simazina, terbutilazina e diurão, determinados nas amostras de água da albufeira do Alqueva, no estudo.	116
<b>Figura.III.2.</b> Representação gráfica do tipo <i>Box-and-Wisker</i> referente à projecção das amostras nos dois principais VF <b>(a)</b> VF1 (fortemente correlacionado com DEA, TBA, metolacloro, diazinão) e VF2 (fortemente correlacionado com o diurão, isoproturão e clorotolorão) no período húmido;	119
<b>Figura.7.</b> Estrutura química do Clorpirifos (adaptado de Moore <i>et al.</i> , 1998).	125
<b>Figura.8.</b> Estrutura química do Endossulfão sulfato (adaptado de GFEA,	130
<b>Figura.9.</b> Estrutura química da Atrazina (adaptado de Solomon <i>et al.</i> , 1996).	133
<b>Figura.10.</b> Estrutura química da hormona 20-HE (adaptado de LaFont, 2000).	149
<b>Figura.11.</b> Estrutura química do composto metilfarnesoato (adaptado de LaFont, 2000).	150
<b>Figura.V.1. (a)</b> Número total de juvenis produzidos por fêmea; <b>(b)</b> comprimento médio dos organismos (média±desvio padrão; n=10). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. * Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de <i>Dunnett's</i> , $p<0,05$ ).	173
<b>Figura.V.2.</b> Toxicidade embrionária resultante da exposição materna e directa, ao clorpirifos (média±desvio padrão; n=12). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. * Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de <i>Dunnett's</i> , $p<0,05$ ).	174
<b>Figura.V.3 (a-g).</b> Fotografia por microscópio óptico, das anomalias de desenvolvimento resultantes da exposição directa (b, c, d) e materna (e, f, g) ao clorpirifos: <b>(a)</b> juvenil normal (controlo); <b>(b)</b> embrião que permaneceu na fase de gastrulação embrionária; <b>(c)</b> embrião na fase 3 de desenvolvimento; <b>(d)</b> juvenil com anomalias na carapaça, cauda e segunda antena; <b>(e, f, g)</b> juvenis com alterações morfológicas na cauda, antena e carapaça, (setas).	175
<b>Figura.V.4.</b> Perfil das anomalias embrionárias resultantes: <b>(a)</b> exposição materna (media±desvio padrão; n=10); e <b>(b)</b> exposição directa (media±desvio padrão; n=12). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo	176
<b>Figura.VI.1.</b> Macho pertencente à espécie <i>D. magna</i> . As setas indicam as principais diferenças entre os dois sexos. Nos machos o bico encontra-se cortado; apresenta pêlos abaixo da cabeça; a primeira antena está muito desenvolvida; não apresenta o gancho que protege os ovos no marsúpio.	185

- Figura.VI.2.** (a) Número total de juvenis produzidos por fêmea; (b) comprimento médio dos organismos; (c) frequência de mudança de carapaça (média±desvio padrão; n=10). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo 188
- Figura.VI.3.** Toxicidade embrionária resultante da exposição materna e directa, ao endossulfão sulfato (média±desvio padrão; n=12). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p<0,05$ ). 191
- Figura.VI.4.** (a-f) Fotografia por microscópio óptico, de anomalias de desenvolvimento resultantes da exposição materna ao endossulfão sulfato: (a) juvenil normal (controlo); (b) juvenil com a cauda curvada; (c) juvenis com diferentes tamanhos; (d) juvenil sem cauda; (e, f) juvenis com várias anomalias, na carapaça, na segunda antena e na cauda. Todos os juvenis com anomalias (b-f) pertencem à mesma geração que o controlo (a). 192
- Figura.VI.5.** (a-d) Fotografia por microscópio óptico, de anomalias de desenvolvimento resultantes da exposição directa ao endossulfão sulfato: (a) juvenil normal (controlo); (b) embrião que permaneceu na fase de gastrulação embrionária (fase 2), de notar a presença de um olho (fase 4); (c) embrião na fase 3 de desenvolvimento; (d) juvenil com anomalias na segunda antena e sem cauda (seta). Todos os juvenis tem a mesma idade que o controlo (a). 193
- Figura.VI.6.** Perfil das anomalias embrionárias resultantes: (a) exposição materna (media±desvio padrão; n=10); e (b) exposição directa (media±desvio padrão; n=12) ao endossulfão sulfato. O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. 194
- Figura.VII.1.** (a) Número total de juvenis produzidos por fêmea; (b) comprimento médio dos organismos (média±desvio padrão; n=10). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p<0,05$ ). 204
- Figura.VII.2.** Toxicidade embrionária resultante da exposição materna e directa à atrazina (média±desvio padrão; n=12). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p<0,05$ ). 206
- Figura.VII.3.** (b-f) Fotografia por microscópio óptico, das anomalias de desenvolvimento resultantes da exposição directa (b-d) e materna (e-g) à atrazina: (a) juvenil normal (controlo); (b) embrião que permaneceu na fase de gastrulação embrionária (fase 2); (c) embrião que permaneceu na 5ª fase de desenvolvimento; (d) embrião com anomalias na cauda e na antena; (e) juvenil com cauda incurvada; (f) juvenil com cauda flectida e antena subdesenvolvida; (g) juvenil sem cauda e com malformações nas antenas. 207
- Figura.VII.4.** Perfil das anomalias embrionárias resultantes: (a) exposição materna (media±desvio padrão; n=10) e; (b) exposição directa (media±desvio padrão; n=12) à atrazina O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como 207
- Figura VIII.1.** Estrutura química do fenoxicarbe (adaptado de Tatarazako e Oda, 2007). 213
- Figura.VIII.2.** Número total de juvenis produzidos por fêmea (média±desvio padrão; n=10). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p<0,05$ ). 217

- Figura.VIII.3.** Número total de juvenis produzidos por fêmea (média ±desvio padrão, n=10) para concentrações de **(a)** endossulfão sulfato (END), **(b)** atrazina (ATR) e **(c)** clorpirifos (CPF) (barras cinzentas) e em mistura com o fenoxicarbe (barras pretas) (FENOX). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo; # Diferença significativa em relação ao pesticida isolado (Teste de *Dunnett's*, 219
- Figura.VIII.4.** Total de machos produzidos (média±desvio padrão; n=10). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p<0,05$ ). 220
- Figura.VIII.5.** Percentagem da produção de machos (média±desvio padrão; n=10), para concentrações de **(a)** endossulfão sulfato (END); **(b)** atrazina (ATR) e **(c)** clorpirifos (CPF) (barras cinzentas) e em mistura com o fenoxicarbe (FENOX) (barras pretas). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo; # Diferença significativa em relação ao pesticida isolado (Teste de *Dunnett's*, 222
- Figura.IX.1.** **(a)** Período de mudança de carapaça; e **(b)** Toxicidade embrionária (média±desvio padrão; n=10), para concentrações de atrazina (ATR) (barras cinzentas) e em mistura com 20-HE (barras pretas). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*;  $p<0,05$ ). 234
- Figura.IX.2.** **(a)** Período de mudança de carapaça; e **(b)** Toxicidade embrionária (média±desvio padrão, n=10), para concentrações de endossulfão sulfato (END) (barras cinzentas) e em mistura com 20-HE (barras pretas). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo; # Diferença significativa em relação ao pesticida sozinho (Teste de *Dunnett's*;  $p<0,05$ ). 236

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela.1.</b> Padrões de Qualidade Ambiental ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) propostos para os pesticidas prioritários do presente estudo (ECC, 2007).	25
<b>Tabela.I.1.</b> Procedimento para a conservação das amostras de água.	49
<b>Tabela.I.2.</b> Parâmetros analíticos, abreviaturas, unidades e técnicas analíticas utilizadas no estudo da qualidade da água da albufeira do Alqueva.	51
<b>Tabela.I.3.</b> Valores médios (média $\pm$ desvio padrão, n=3) e limites (mínimo - máximo) dos parâmetros de estratificação: pH, temperatura e oxigénio dissolvido, durante o período de estudo.	56
<b>Tabela.I.4.</b> Valores médios (média $\pm$ desvio padrão, n=3) e limites (mínimo - máximo) do parâmetro condutividade eléctrica, durante o período de estudo.	57
<b>Tabela.I.5.</b> Coeficientes de correlações de <i>Pearson</i> (r) entre os 26 parâmetros do estudo (n=81).	71
<b>Tabela.I.6.</b> Coeficientes de correlação das 26 variáveis iniciais (atributos) nos seis VFs obtidos no estudo.	74
<b>Tabela.II.1.</b> Composição química, pH e dureza do meio de cultura (ASTM hard water) (Soares, 1989).	87
<b>Tabela.II.2.</b> Valores de 30 min-EC <sub>50</sub> (%) (média desvio padrão; n=2), para a bactéria <i>V. fischeri</i> , nos vários locais de amostragem ((Sra. Ajuda (Aj), Alcarrache (Ac), Álamos-Captação (Al), Alqueva-Montante (Mt), Alqueva-Mourão (Mr), Lucefecit (Lf), Alqueva-Jusante (Jz), Ardila-confluência (Ar) e Moinho das Barcas (MB)), durante o estudo.	97
<b>Tabela.II.3.</b> Valores de 24h-EC <sub>50</sub> (%) (média desvio padrão; n=4) para o <i>T. platyurus</i> , nos vários locais de amostragem ((Sra. Ajuda (Aj), Alcarrache (Ac), Álamos-Captação (Al), Alqueva-Montante (Mt), Alqueva-Mourão (Mr), Lucefecit (Lf), Alqueva-Jusante (Jz), Ardila-confluência (Ar) e Moinho das Barcas (MB)) durante o estudo.	98
<b>Tabela.II.4.</b> Coeficientes de correlação de <i>Spearman R</i> entre os parâmetros analíticos e os efeitos ecotoxicológicos obtidos nas amostras de água (n=20).	103
<b>Tabela.III.1.</b> Parâmetros de performance do método: tempo de retenção ( $t_R$ ), limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e coeficientes de correlação linear ( $r^2$ ).	111
<b>Tabela.III.2.</b> Valores médios ( $\text{ng L}^{-1}$ ), limites e percentagem de detecção dos pesticidas determinados nas amostras de água, da albufeira do Alqueva, no estudo (n=81).	114
<b>Tabela III.3.</b> Coeficientes de correlação dos 16 pesticidas nos três VF obtidos no estudo (n=81).	118
<b>Tabela.2.</b> Propriedades químicas do clorpirifos (Racke, 1993; Moore <i>et al.</i> , 1998).	124
<b>Tabela.3.</b> Propriedades químicas dos isómeros do endossulfão e do metabolito endossulfão sulfato (Goerlitz e Eyrich, 1987; Ngabé e Bidleman, 2001).	129
<b>Tabela.4.</b> Propriedades químicas da atrazina (RSCIS, 1991).	133
<b>Tabela.5.</b> Exemplos de desregulação endócrina em invertebrados (deFur, 2004).	141
<b>Tabela.6.</b> Descrição dos bioensaios de <i>screening</i> ( <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ) da 1ª etapa de avaliação de desreguladores endócrinos recomendados pela EDSTAC (Erikson, 1998).	143
<b>Tabela.7.</b> Descrição dos bioensaios <i>in vivo</i> da 2ª etapa de avaliação de desreguladores endócrinos, recomendados pela EDSTAC (Erikson, 1998).	144

<b>Tabela.8.</b> Exemplos de bioensaios utilizados na avaliação de desregulação endócrina em invertebrados (deFur, 2004)	146
<b>Tabela.IV.1.</b> Toxicidade aguda (EC <sub>50</sub> ; expresso pela média (95% Intervalos de Confiança) dos pesticidas em estudo (atrazina, endossulfão sulfato e clorpirifos) nas espécies <i>V. fischeri</i> , <i>T. platyurus</i> e <i>D. magna</i> .	162
<b>Tabela.VI.1.</b> Efeitos do endossulfão sulfato ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) na diferenciação sexual do crustáceo <i>D. magna</i> . O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. Os resultados foram expressos por média $\pm$ desvio padrão (n=10). * Indica que o declive dos coeficientes de regressão obtidos por regressão logística, foi estatisticamente significativo ( $p<0,001$ ).	190
<b>Tabela.VII.1</b> Efeito da atrazina ( $\text{mg L}^{-1}$ ) na diferenciação sexual do crustáceo <i>D. magna</i> . O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. Os resultados foram expressos por média $\pm$ desvio padrão (n=10). * Indica que o declive dos coeficientes de regressão obtidos por regressão logística, foi estatisticamente significativo ( $p<0,001$ ).	205
<b>Tabela.VIII.1.</b> Valores de EC <sub>50</sub> (média $\pm$ desvio padrão; n=10) para a produção de machos, estimados a partir de regressão logística, dos pesticidas endossulfão sulfato, atrazina e do análogo da hormona juvenóide fenoxicarbe, isolados e em mistura.	223
<b>Tabela.IX.1.</b> Número total de juvenis produzidos por fêmea, durante os 21 dias de exposição (média $\pm$ desvio padrão, n=10). Foi usado o ASTM + DMSO como controlo negativo. * Diferença significativa em relação ao controlo $p<0,05$ .	232
<b>Tabela.IX.2.</b> Valores de EC <sub>50</sub> (média $\pm$ desvio padrão, n=12) para a indução de toxicidade embrionária, estimados a partir de regressão logística, dos pesticidas endossulfão sulfato, atrazina e da hormona 20-HE, isolados e em mistura.	237

## GLOSSÁRIO

Ac	Alcarrache
ACL	Análise de <i>Cluster</i>
ACP	Análise de Componentes Principais
ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
AF	Análise de Factores
Aj	Sra. Ajuda
Al	Álamos-Captação
APHA	<i>America Public Health Association</i>
Ar	Ardila-Confluência
ASTM	<i>America Society for Testing Materials</i>
ATR	Atrazina
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Register</i>
CBO <sub>5</sub>	Carência Bioquímica de Oxigénio ao 5º dia
CMA	Concentração Máxima Admissível
CE	Condutividade Eléctrica
COT	Carbono Orgânico Total
CPs	Componentes Principais
CPF	Clorpirifos
CQO	Carência Química de Oxigénio
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoacético
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DEA	Desetilatrizina
DEs	Desreguladores Endócrinos
DIA	Desisopropilatrazina
DIN	<i>German Institute for Standardization</i>
DMSO	DimetilSufóxido
EAA	Espectrometria de Absorção Atómica
EAM	Espectrometria de Absorção Molecular
EC <sub>50</sub>	Concentração que promove um efeito, em 50% da população exposta
ECC	<i>European Community Commission</i>
EDIA	Empresa de Desenvolvimento e Infra-estruturas do Alqueva, SA
EDSTAC	<i>Endocrine Disruptor Screnning and Testing Advisory Committee</i>
EEA	<i>European Environmental Agency</i>
END	Endossulfão sulfato
Ent. F.	Enterococcus Fecais
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
<i>et al.</i>	e colaboradores
EXTONET	<i>Extension Toxicology Network</i>
FCE	Fotometria de Chama de Emissão
FENOX	Fenoxicarbe

20-HE	20-hidroxiectdisone
HIM	Hormona de Inibição da mudança de carapaça
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
ISO	<i>International Standard Organization</i>
Jz	Alqueva-Jusante
LD	Limite de Detecção
Lf	Lucefecit
LOEC	<i>Lowest Observed Effect Concentration</i>
LQ	Limite de Quantificação
MA	Média Anual
MCPA	2-metil-clorofenoxiacético
Mb	Moinho das Barcas
MET	Metolacoloro
Mr	Alqueva-Mourão
Mt	Alqueva-Montante
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>
NOEC	<i>No Observed Effect Concentration</i>
OCDE	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OD	Oxigénio Dissolvido
Oxid	Oxidabilidade
PQA	Padrões de Qualidade Ambiental
$r^2$	Coefficiente de Correlação Linear
RA	Receptor Androgénio
RE	Receptor Estrogénio
Redox	Potencial Redox
Rec	Receptor Ecdisteróide
RRX	Receptor dos Retinóides X
RSCIS	<i>Royal Society of Chemistry Information Services</i>
SMZ	Simazina
SPE-LC-MS/MS	Extracção em fase sólida <i>on-line</i> seguida de cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massas <i>tandem</i>
T	Temperatura
2,4,5-T	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
T. Coli	Coliformes Totais
TBA	Terbutilazina
$T_R$	Tempo de Retenção
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USNLM	<i>United States National Library of Medicine</i>
USPHS	<i>United States Public Health Services</i>
UV	Ultra-Violeta
VF	Varifactor
VMA	Valor Máximo Admissível
VMR	Valor Máximo Recomendado



## **INTRODUÇÃO GERAL**



Uma característica fundamental do planeta Terra é a sua abundância em água. Esta cobre 75% da superfície terrestre, da qual mais de 97% se encontra nos oceanos. As quantidades relativamente pequenas de água doce que correm nos lagos e rios devem a sua importância basicamente à manutenção da vida terrestre (Wetzel, 1993). Assim, apesar de a terra estar na sua maioria coberta por água, só uma pequena porção pode ser utilizada para abastecimento das populações: (i) 96,7% encontra-se nos oceanos (água salgada que não pode ser usada nem para abastecimento, nem para rega ou para a indústria); (ii) aproximadamente 1,7% nos glaciares; (iii) 1,7% armazenados em rios, lagos, lençóis freáticos, ribeiros e no solo e (iv) cerca de 0,001% está sob a forma de vapor na atmosfera ([www.earthobservatory.nasa.gov/library/water/](http://www.earthobservatory.nasa.gov/library/water/) acedido em 4 Julho de 2008). De acordo com Gleick (1996) os lençóis freáticos constituem 30% da água doce disponível, enquanto os glaciares constituem 69% do seu total. Assim, menos de 3% do total da água doce existente apresenta características de qualidade que lhe permitem a sua utilização no consumo e nas restantes actividades humanas.

O aproveitamento dos recursos de água doce superficial coloca a evidente necessidade de construção de barragens cujas albufeiras, constituídas por massas de águas fortemente modificadas/artificiais, regularizem os cursos de água e, idealmente, optimizem a disponibilidade de água colhida e escoada em cada bacia hidrográfica.

As albufeiras são massas de água fortemente modificadas com problemas ambientais inerentes, em particular no Sul da Europa, onde as temperaturas elevadas e as fracas precipitações, associadas a um prolongado período seco, ditam uma fraca renovação da água e uma forte evaporação. Isto potencia os efeitos adversos do excessivo aporte de nutrientes em resultado de práticas agrícolas intensivas, resultando na acidificação da água e em processos de eutrofização, com consequente desenvolvimento de florescências de algas potencialmente tóxicas como as cianobactérias e a depleção em oxigénio. Estes processos promovem, *per si*, a deterioração dos meios hídricos e a diminuição da biodiversidade. Além disso, o aumento da irrigação possibilitado por estas albufeiras promove práticas agrícolas mais agressivas que libertam, por escorrência, maiores concentrações de pesticidas, um dos grupos de substâncias perigosas que acarreta maior preocupação para a gestão sustentável da qualidade das massas de água superficiais.

O caso de estudo deste trabalho é a albufeira do Alqueva, localizada na Bacia Hidrográfica do Guadiana, na região do Alentejo (Sul de Portugal). Se, por um lado, a região do Alentejo apresenta fortes carências em termos hídricos, por outro lado tem solos de elevada aptidão agrícola e a agricultura como principal actividade do sector primário. Assim, os usos principais preconizados para a água da albufeira do Alqueva são a rega, a produção de energia hidroeléctrica e o abastecimento das populações. No entanto, a Bacia Hidrográfica do Guadiana está sujeita a uma série de pressões ambientais que se reflectem na qualidade da água e que podem por em causa a utilização da água para os fins a que está destinada (Decreto-Regulamentar nº 16/2001).

Os objectivos prioritários da Directiva Quadro da Água (ECC, 2000) até 2015 convergem na necessidade da implementação de medidas de gestão de risco, para atingir os objectivos de qualidade ambiental, ou seja, o “bom potencial ecológico” no que respeita a massas de água fortemente modificadas. Para isso é necessário caracterizar essas massas de água no que respeita ao risco ecológico a que estão expostas, tendo-se reconhecido os ensaios ecotoxicológicos como ferramentas valiosas na avaliação de impactos ecológicos de contaminantes e da interacção do ambiente biótico e abiótico (Antunes *et al.*, 2007; van Straalen e Gestel, 2008).

Assim, é urgente caracterizar e avaliar este ecossistema para se necessário recorrer à implementação de medidas de mitigação que revertam os efeitos negativos observados, com o objectivo último de garantir e atingir as metas propostas pela União Europeia até 2015, para massas de água fortemente modificadas.

No que respeita aos “stressores” químicos, os pesticidas são, dos grupos de substâncias perigosas, os que acarretam maior preocupação para a gestão sustentável da qualidade das massas de água superficiais. A caracterização das águas de superfície no que respeita aos pesticidas predominantes é de extrema importância numa região como o Alentejo, pois a maioria destes compostos são usados de uma forma indiscriminada. Por outro lado, este grupo de substâncias está caracterizado como um dos principais grupos de poluentes que influenciam de forma negativa o ecossistema aquático e a qualidade da massa de água da Bacia Hidrográfica do Rio Guadiana (IA, 2005).

A quantificação e a avaliação toxicológica dos pesticidas identificados na massa de água são duas das etapas necessárias para a caracterização do risco ambiental promovido por estes compostos e, conseqüentemente, para uma melhor gestão sustentável dos recursos hídricos da albufeira do Alqueva.

Muitos dos pesticidas utilizados nas actividades agrícolas do Alentejo apresentam toxicidade aguda e crónica elevada para organismos não alvo, e podem pôr em causa o normal desenvolvimento de populações do ecossistema aquático em estudo. A toxicidade crónica de alguns pesticidas pode estar correlacionada com o seu efeito no sistema endócrino, alterando taxas de reprodução, taxas de diferenciação sexual e promovendo alterações embrionárias graves. Estes efeitos podem ser as causas de decréscimos populacionais acentuados.

Assim, neste contexto, os objectivos gerais do presente trabalho são: (i) a avaliação integrada da qualidade da massa de água do Alqueva; (ii) identificação, quantificação e avaliação da dinâmica dos principais pesticidas que se encontram na massa de água; (iii) avaliação da toxicidade aguda e crónica e das características de desregulação do sistema endócrino do crustáceo *Daphnia magna*, de três dos pesticidas quantificados na albufeira.

Para responder aos objectivos do estudo, este trabalho foi dividido em três partes:

**Parte A, Parte B e Parte C.**

**Parte A**, que integra os capítulos **I, II e III** inerentes à avaliação integrada da qualidade da água e à dinâmica dos principais pesticidas na massa de água. A **Parte B**, que corresponde à avaliação toxicológica (aguda, crónica e de desregulação endócrina) dos pesticidas em estudo (clorpirifos, endossulfão sulfato e atrazina), que integra os capítulos **IV, V, VI, VII, VIII e IXI**. A **Parte C**, que apresenta as conclusões gerais do trabalho e sugere trabalhos futuros de investigação a desenvolver.

## **PARTE A - AVALIAÇÃO INTEGRADA DA QUALIDADE DE ÁGUA EM ALBUFEIRAS: O CASO DE ESTUDO DA ALBUFEIRA DO ALQUEVA**

**Capítulo I** – Caracterização e quantificação dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e de substâncias perigosas da massa de água da albufeira de Alqueva. Neste grupo de ensaios avaliou-se quais os parâmetros que maior influência exercem na variabilidade da qualidade da água da albufeira. No que respeita aos pesticidas foi avaliado um total de seis pesticidas (atrazina, simazina, terbutilazina, metolacloro, clorpirifos e endossulfão sulfato).

**Capítulo II** – Avaliação do potencial toxicológico da água da albufeira de Alqueva. Neste grupo de ensaios foram realizados ensaios ecotoxicológicos agudos e crónicos com os organismos aquáticos *Vibrio fisheri*, *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna*. Determinamos quais as espécies mais sensíveis para serem integradas em futuros programas de caracterização ecológica da qualidade da água. Tentámos correlacionar a toxicidade observada com a dinâmica de alguns dos parâmetros químicos e substâncias perigosas identificados na albufeira.

**Capítulo III** - Este grupo de ensaios foi efectuado, com o objectivo de alargar o grupo de pesticidas analisados na água da albufeira, bem como o acesso a metodologias de maior sensibilidade e precisão. Neste estudo foram analisados catorze pesticidas pertencentes às classes de triazinas (atrazina, cianazina, simazina, terbutilazina e os produtos de degradação deisopropilatrazina e desetilatrazina), fenilureias (clortolurão, diurão, isoproturão e linurão), cloroacetanilidas (alacloro e metolacloro), organofosforados (diazinão, dimetoato e malatião) e tiocarbamatos (molinato). Este estudo incluiu cinco pesticidas que estão na lista das 33 substâncias prioritárias na Directiva Quadro da Água (alacloro, atrazina, diurão, isoproturão e simazina).

**PARTE B – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DAS PROPRIEDADES  
ENDÓCRINAS DE PESTICIDAS (ATRAZINA, ENDOSSULFÃO SULFATO E  
CLORPIRIFOS) QUANTIFICADOS NA ALBUFEIRA DO ALQUEVA**

**Capítulo IV** – Avaliação ecotoxicológica aguda dos pesticidas seleccionados com acesso aos organismos aquáticos *V. fischeri*, *T. platyurus* e *D. magna*.

**Capítulo V, VI, VII** – Estes capítulos abordam a avaliação da toxicidade crónica dos pesticidas clorpirifos, endossulfão sulfato e atrazina, respectivamente. Os ensaios para a avaliação da toxicidade crónica incluíram: (i) ensaios de reprodução com duração de 21 dias, cujos parâmetros de avaliação foram o número de juvenis produzidos por *Daphnia*, a frequência de mudança de carapaça, o comprimento dos juvenis, o aparecimento de machos e, o aparecimento de juvenis com malformações e, (ii) ensaio *in vitro* de embriotoxicidade, cujo parâmetro de avaliação foi a embriotoxicidade observada durante as seis fases de desenvolvimento embrionário.

**Capítulo VIII** – Caracterização da actividade juvenóide dos pesticidas no sistema endócrino da *D. magna*. Neste grupo de ensaios avaliamos a capacidade dos pesticidas para promover o aparecimento de machos na população teste, ou seja, para actuar como agonista do sistema juvenóide do crustáceo. Foi igualmente preconizado, um outro grupo de ensaios, para avaliar a capacidade dos pesticidas de antagonizarem/reverterem o efeito de um potente agonista do sistema juvenóide juvenóide da *D. magna*, o fenoxicarbe.

**Capítulo XIX** - Avaliação da actividade ecdiesteróide dos pesticidas no sistema endócrino da *D. magna*. Os ensaios para a avaliação da actividade ecdiesteróide basearam-se na análise de dois parâmetros de avaliação dependentes da actividade do sistema ecdiesteróide na *D. magna*: a frequência da mudança de carapaça (contagem do nº de dias que os organismos levam a realizar quatro mudanças de carapaça) e a embriotoxicidade. Para a confirmação da actividade ecdiesteróide, ou seja, comprovar que os efeitos observados foram devidos a actuação dos pesticidas no sistema ecdiesteróide do crustáceo, realizou-se outro grupo de ensaios em que se avaliou a capacidade de reversão do efeito causado pelo químico na presença da hormona 20-hidroxiecdisona (hormona responsável pela actividade ecdiesteróide no crustáceo *D. magna*).

## **PARTE C – CONCLUSÕES FINAIS**

**PARTE A**

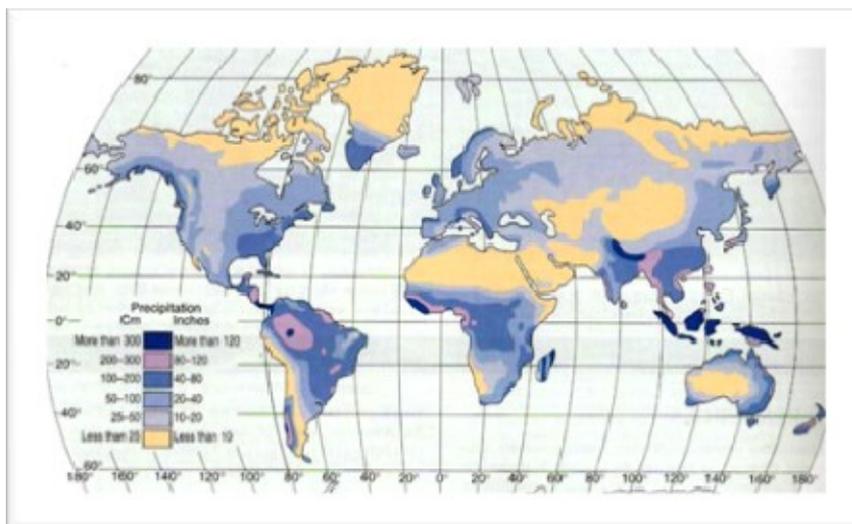
**AVALIAÇÃO INTEGRADA DA QUALIDADE  
DA ÁGUA EM ALBUFEIRAS: O CASO DE ESTUDO  
DA ALBUFEIRA DO ALQUEVA**



## GESTÃO SUSTENTÁVEL DOS RECURSOS HÍDRICOS

A água é um recurso indispensável à grande maioria das actividades económicas, com uma influência decisiva na qualidade de vida das populações nomeadamente no que respeita ao abastecimento, à drenagem e tratamento de águas residuais, e à irrigação agrícola actividades com forte impacto na saúde pública (Baptista *et al.*, 2001).

Embora cerca de 30% da água doce já tenha sido utilizada, a existente, se for bem gerida, é ainda suficiente para abastecer cerca de 20 biliões de pessoas. No entanto, e devido a condições climáticas e geológicas a água não está uniformemente distribuída e, num mundo de 6 biliões de pessoas, muitas áreas do globo sofrem severas necessidades de água (McKinney e Schoch, 1998). Um dos factores ligados à carência de água é a variabilidade no ciclo hidrológico, que induz a existência de regiões onde a precipitação é elevada e regiões completamente áridas (Jackson *et al.*, 2001). Se considerarmos a distribuição da precipitação e do escoamento anual médio no globo, verificamos disparidades brutais (Fig. 1). Assim, em muitas regiões, embora o volume de água disponível médio possa ser suficiente para cobrir as necessidades de consumo noutras, existem longos períodos em que há carência de água e, em contrapartida, ocorrem cheias que não só correspondem ao escoamento de grandes quantidades de água desperdiçada como também determinam, em geral, uma série de prejuízos socio-económicos e de saúde pública. Esta realidade é agravada pela falta de conservação, pela poluição dos recursos hídricos e, pela má gestão dos mesmos, factores promovidos pela utilização excessiva e incorrecta pelo homem (Cunningham e Cunningham, 2004).



**Figura 1.** Distribuição da precipitação média anual no mundo (adaptado de Cunningham e Cunningham, 2004).

Em termos de sector de actividade, os volumes necessários para satisfazer as necessidades de água para abastecimento doméstico são pequenos quando comparados com as disponibilidades. A agricultura é o maior utilizador de água, sendo a rega responsável por cerca de 80% do consumo mundial de água (McKinney e Schoch, 1998; Cunningham e Cunningham, 2004). As necessidades da água para a indústria são muito mais flexíveis e adaptáveis às disponibilidades, por outro lado, a quantidade de água utilizada por este sector que retorna ao meio receptor é superior à correspondente utilizada pela agricultura (Bartram e Helmer, 1996).

Na Europa existem duas realidades no que respeita aos gastos de água com o sector agrícola: (i) Europa do Norte, onde os gastos de água com a actividade agrícola não são das actividades que apresentam maior consumo: e (ii) Mediterrâneo, nomeadamente Portugal e Grécia, onde a rega é uma actividade essencial para a produção com o consequente aumento da pressão na utilização dos recursos hídricos (Albiac *et al.*, 2005). Dados obtidos para Portugal, com base no Plano Nacional da Água, indicam que a agricultura é o maior utilizador de água com um volume total de cerca de  $6\,550 \times 10^6 \text{ m}^3 \text{ ano}^{-1}$  (87% do total), seguida do abastecimento urbano às populações  $570 \times 10^6 \text{ m}^3 \text{ ano}^{-1}$  (8% do total) e da indústria com um volume total de  $385 \times 10^6 \text{ m}^3 \text{ ano}^{-1}$  (5% do total) (Baptista *et al.*, 2001).

Pelo que anteriormente se referiu, é evidente a necessidade de promover medidas que preservem a qualidade e aumentem a eficiência da utilização dos recursos hídricos. Tais medidas podem reunir-se em três grupos: (i) medidas conducentes ao melhor aproveitamento dos recursos hídricos disponíveis (retenção de reservas hídricas, transferência de reservas hídricas, controlo da poluição); (ii) medidas conducentes a um aumento dos recursos hídricos (dessalinização da água do mar, reordenamento agro-florestal); e (iii) medidas conducentes à redução do consumo (reutilização de águas residuais, recirculação de água, microirrigação, principio poluidor-pagador e utilizador-pagador) (Veiga da Cunha *et al.*, 1980; McKinney e Schoch, 1998; Albiac *et al.*, 2005; Correljé *et al.*, 2007).

Em 2000, os estados membros elaboraram um documento onde estão descritos um conjunto de medidas e objectivos propostos para as massas de água Europeias até 2015. Assim, a Directiva Quadro da Água (ECC, 2000) estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da Água e tem como objectivos ambientais até 2015: (i) evitar a deterioração do estado das massas de água; (ii) alcançar e manter o “bom estado ecológico” das águas superficiais; (iii) alcançar e manter o “bom potencial ecológico das águas fortemente modificadas ou artificiais; (iv) reduzir gradualmente a poluição promovida por substâncias prioritárias e eliminar as emissões, descargas e perdas dessas substâncias; (v) promover a utilização sustentável da água (preço da água deve cobrir os custos necessários ao seu tratamento, os custos ambientais e de pesquisa e a identificação de novos recursos hídricos (Albiac *et al.*, 2005; EEA, 2005).

## CARACTERIZAÇÃO DE MASSAS DE ÁGUA DE ALBUFEIRAS

O aproveitamento dos recursos de água doce superficial coloca a evidente necessidade de construção de barragens cujas albufeiras são constituídas por massas de água fortemente modificadas/artificiais. As albufeiras são massas de água lântica que nos habituamos a considerar como parte integrante da paisagem ibérica. Contudo ao existirem, constituem também ecossistemas onde espécies e comunidades se estabelecem, com uma dinâmica própria. Como se tratam de meios artificiais sujeitos a grandes variações espaço-temporais impressas pelo regime de uso dos recursos hídricos as comunidades existentes e a sua qualidade biológica ou degradação estão também, muito dependentes do regime de uso da albufeira ou da bacia de drenagem.

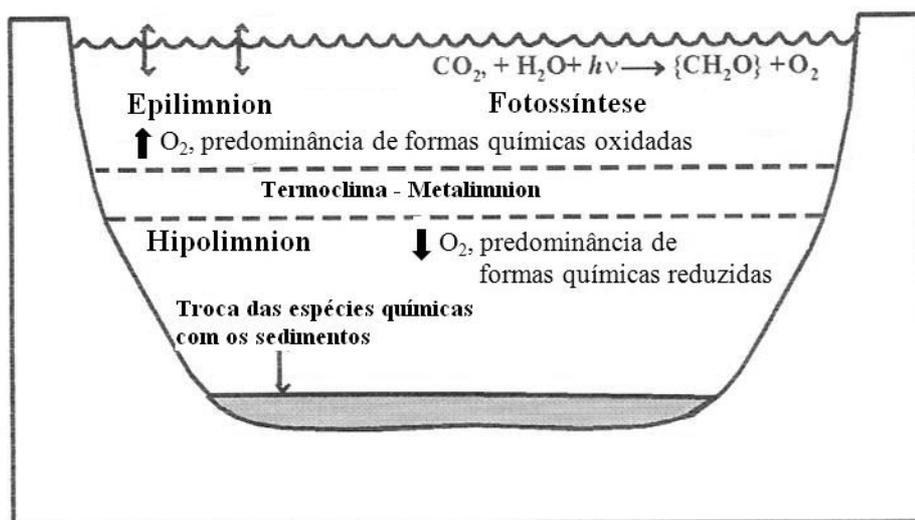
De uma maneira geral os ecossistemas aquáticos integrados nas albufeiras estão dependentes principalmente de cinco grupos de factores ambientais que regulam a sua estrutura e funcionalidade: (i) o fluxo (define as taxas de precipitação e os caminhos pelos quais as águas das chuvas entram na circulação das massas de água superficiais bem como os tempos de residência nesses ecossistemas); (ii) os sedimentos e a matéria orgânica (o movimento dos sedimentos e os influxos de matéria orgânica são importantes para a estrutura e dinâmica do ecossistema. A matéria orgânica que provém dos solos circundantes é uma fonte de energia e nutrientes para os organismos aquáticos); (iii) temperatura e luz que são influenciadas principalmente pelo clima, pela composição química da massa de água e dos sedimentos que a constituem e pela produtividade algal. A temperatura influencia quer a distribuição das espécies na massa de água, quer o ciclo dos nutrientes e a distribuição do oxigénio dissolvido; (iv) nutrientes e composição química, dependentes principalmente, das condições climáticas, geomorfológicas e geoquímicas dos materiais (Donohue *et al.*, 2005) e que regulam o pH, a produtividade das plantas e a qualidade da água; (v) espécies endémicas do ecossistema aquático (Baron *et al.*, 2003; Townsend *et al.*, 2004).

Assim, no que respeita às características hidrológicas, as massas de água das albufeiras são caracterizadas por uma velocidade média muito baixa e variável entre 0,001 a 0,01 ms<sup>-1</sup>. A água apresenta tempos de residência elevados e a corrente é multi-direccional (Manahan, 2000).

A temperatura e a luz são propriedades da massa de água influenciadas pelo clima e topografia da região, assim como pelas características da própria massa de água: composição química, sedimentos e produtividade algal. A temperatura da água regula directamente as concentrações de oxigénio, as taxas metabólicas dos organismos aquáticos e está associada aos processos de crescimento, reprodução e maturação das comunidades aquáticas (Wetzel, 2001). O aumento da temperatura pode influenciar a solubilidade dos sais e dos gases nas massas de água aumentando a condutividade da mesma e diminuindo a quantidade de oxigénio dissolvido.

Durante os períodos mais quentes do ano, em regiões temperadas, muitas massas de água de profundidade média apresentam estratificação térmica. Este fenómeno ocorre devido ao aquecimento do estrato de água superficial ser mais rápido do que a distribuição do calor na coluna de água. Assim, à medida que a água superficial aquece e se torna menos densa, a resistência térmica à mistura aumenta, com a consequente estratificação da massa de água (Wetzel, 2001).

A estratificação caracteriza-se pela formação de três zonas: *epilimnion*, estrato superior da água menos densa, mais ou menos uniformemente aquecida, que circula e possui alguma turbulência; *hipolimnion* o estrato inferior das águas mais densas, mais frias e relativamente calmas, que são subjacentes ao *epilimnion*; *metalimnion* estrato intermédio de alterações térmicas acentuadas situado entre os dois estratos anteriores (Fig. 2) (Manahan, 2000).



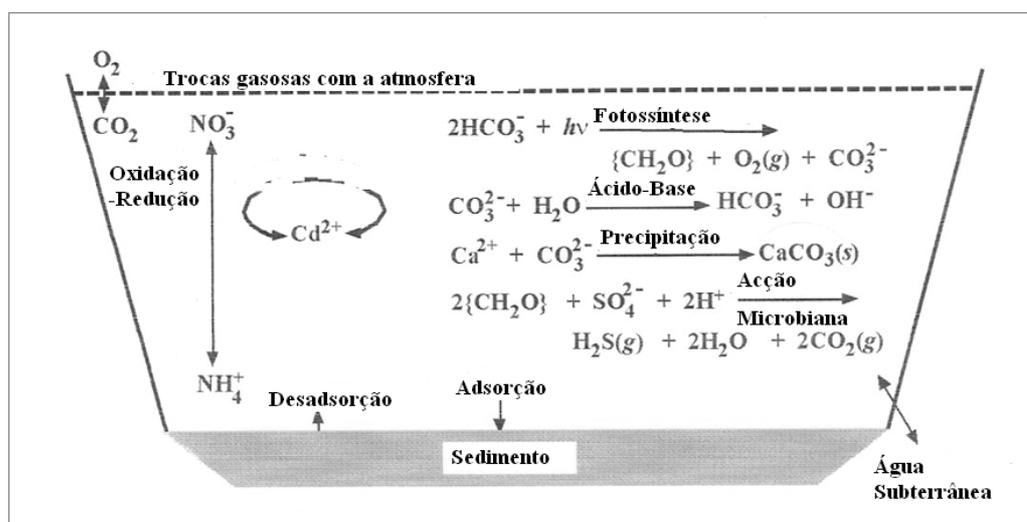
**Figura 2.** Estratificação térmica típica de regiões temperadas nos períodos mais quentes (adaptado de Manahan, 2000).

No final da estratificação térmica, quando a perda de calor é superior à absorção, as águas superficiais do *epilimnion* arrefecem, tornam-se mais densas e misturam-se com os estratos mais profundos. O *metalimnion* sofre uma erosão progressiva à medida que se reduz a resistência térmica relativa à mistura. Posteriormente todo o volume de água é incluído na circulação e inicia-se a circulação de Outono/Inverno.

Um problema associado à estratificação térmica é a potencial variação na qualidade da água, produzida por oscilações cuja amplitude (que depende dos fins operativos a que a água se destina) promove a mistura das duas zonas de água com características completamente distintas. Assim pode acontecer uma água superficial com características *epilimnionicas* (quente, oxigenada e com elevada densidade algal) e características *hipolimnionicas* (fria, anóxica, elevada concentração de ferro, manganês e sulfato de hidrogénio) (Thornton *et al.*, 1996).

O total de gases dissolvidos na água encontra-se entre 30 a 50  $\text{cm}^3\text{L}^{-1}$ , variando os seus valores com a temperatura e a salinidade. O oxigénio, produto da actividade fotossintética, constitui um factor determinante do tipo de metabolismo dominante dos organismos que se desenvolvem na massa de água. Este representa cerca de 2/5 do total dos gases, em condições aeróbias, na época de maior eficiência dos organismos fitoplanctónicos (Wetzel, 2001). A solubilidade do oxigénio na água diminui com o aumento da temperatura e com pressões atmosféricas mais baixas e altitudes mais elevadas (Mariolakos *et al.*, 2007). Nas camadas superficiais das massas de água as concentrações de oxigénio dissolvido são dominadas principalmente pelos processos fotossintéticos e pelas trocas interface ar-água, contrabalançados pela temperatura e por factores hidrodinâmicos (turbulência e vento). Nas camadas profundas a sua disponibilidade é controlada pelo metabolismo de consumo da matéria orgânica.

O carbono inorgânico é um dos principais nutrientes do metabolismo fotossintético (Wetzel, 2001). O carbono inorgânico existe nas massas de água superficiais num equilíbrio dinâmico entre três formas principais: dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), ião bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e ião carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). O  $\text{CO}_2$  representa cerca de 1/5 dos gases dissolvidos e o seu teor depende da luminosidade, da temperatura e dos nutrientes disponíveis para a fotossíntese, na água este é solubilizado e forma ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) que rapidamente é dissociado em  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ . O  $\text{CO}_2$  pode encontrar-se em situação de completo esgotamento quando as condições para a actividade dos autotróficos fotossintetizadores (fitoplancton e macrófitas) forem óptimas. Assim, em presença de luz solar ocorre o consumo de  $\text{CO}_2$  com a formação de matéria orgânica através da fotossíntese e o consequente aumento do pH, pela diminuição dos iões de hidrogénio ( $\text{H}^+$ ) e o aumento do ião  $\text{CO}_3^{2-}$  (Fig. 3) (Manahan, 2000).



**Figura 3.** Principais reacções químicas que ocorrem na massa de água (adaptado de Manahan, 2000).

O azoto é um dos nutrientes que influencia a produtividade nas massas de água doce. Uma das principais fontes de azoto na biosfera é a fixação do azoto molecular atmosférico ( $N_2$ ). Nos sistemas aquáticos as formas mais comuns de azoto são amónia ( $NH_3-N$ ), nitritos ( $NO_2^- -N$ ) e nitratos ( $NO_3^- -N$ ). O ciclo do azoto nas albufeiras é de natureza biológica, ou seja, as reacções de oxidação e redução dos compostos azotados estão ligadas à assimilação do azoto pela fotossíntese e à sua utilização por algas e plantas vasculares e por microorganismos (Vitousek *et al.*, 1997). A amónia existe principalmente sob a forma de iões amónia ( $NH_4^+ -N$ ) e é assimilada pelas plantas da zona trofógena (estrato superficial da massa de água onde a quantidade de luz é apropriada para a realização de fotossíntese). A concentração de  $NH_4^+ -N$  nas águas oxigenadas é geralmente baixa, por ser usada no processo da nitrificação, para a formação de  $NO_3^- -N$  (reacção realizada principalmente por *Nitrosomonas sp*) e  $NO_2^- -N$  (reacção realizada principalmente por *Nitrobacter sp*) (Valiela *et al.*, 2000). O  $NO_2^- -N$  é oxidado rapidamente e por isso raramente se acumula, sendo a sua concentração geralmente muito baixa (inferior a  $100 \mu g L^{-1}$ ) (EPA, 2003). O  $NO_3^- -N$  é a forma mais vulgar em que o azoto inorgânico se encontra nas águas doces. A desnitrificação é realizada por várias espécies de bactérias heterotróficas facultativas (organismos que

tanto podem usar o oxigénio, como o nitrato como aceitador final de electrões) e pode ocorrer tanto em ambientes anaeróbios como aeróbios (Whitehead, 1992).

Em sistemas aquáticos de água doce o fósforo desempenha um papel muito importante no metabolismo dos organismos. Em comparação com outros nutrientes necessários aos organismos, o fósforo é o menos abundante e, por essa razão, é frequentemente o elemento limitante da produtividade biológica. As taxas de sobrecarga variam muito com a aplicação que se dá ao solo adjacente à bacia de drenagem, à geologia e a morfologia da bacia, à produtividade do solo e à actividade humana (Sharpley *et al.*, 1993; Daniel *et al.*, 1998; Schoumans e Groenendijk, 2000; Simard *et al.*, 2000). Uma vez que o fósforo existe na forma particulada a sedimentação representa um processo de perda de fósforo da coluna de água para o sedimento. A gama de fósforo total (Pt) nas águas doces varia de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  nas águas pouco produtivas até mais de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  em águas muito eutróficas. As águas doces não contaminadas contêm em geral entre 10 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (EPA, 2003).

Os microelementos metálicos com valor nutritivo presentes nas massas de água superficiais compreendem o ferro (Fe), o manganês (Mn), o zinco (Zn), o cobre (Cu), o boro (B), o cobalto (Co), o molibdénio (Mo) e o vanádio (V). Todos eles são necessários ao desenvolvimento das plantas e dos animais do ecossistema aquático (Wiessner, 1962). No entanto, quase todos os micronutrientes metálicos são muito tóxicos quando estão em excesso ou quando formam complexos orgânicos (McKnight, 1981).

As espécies que vivem nestes ecossistemas reflectem as características da região e a capacidade de colonizar e sobreviver na massa de água.

Assim, o fitoplancton de água doce compreende algas que pertencem praticamente a todos os grupos taxionómicos importantes: cianobactérias, algas verdes, xantofíceas, crisofíceas, diatomáceas, dinoflagelados, algas castanhas e vermelhas (Wetzerl, 2001). O metabolismo autotrófico é a principal via metabólica pela qual se realiza a síntese de matéria orgânica na maioria das algas. No entanto, algumas algas encontram-se adaptadas a ambientes com pouca luz, onde a heterotrofia é o processo metabólico dominante (Neilson e Lewin, 1974).

Na água doce temperada verifica-se uma redução da taxa populacional durante o Inverno e com a profundidade quando a intensidade de luz e a temperatura diminuem (Richerson *et al.*, 1978).

O zooplankton de água doce está distribuído em três grupos dominantes: os Rotifera e duas subclasses de Crustaceos, os Cladocera e os Copepoda.

As comunidades de plantas do litoral (zona de interface entre a parte terrestre da bacia de drenagem e a água ao largo da albufeira) neste tipo de ecossistema são predominantemente constituídas por macrófitas (emergentes, folhas flutuantes, submersas, flutuantes) (Wetzel, 2001).

No que respeita aos animais bentónicos de água doce a diversidade é enorme: os protozoários de água doce, os nemátodes, os anélídeos aquáticos (oligoquetas e sanguessugas), os microcrustáceos bivalves ostracódos, os crustáceos malacostráceos (misídeos, isópodes, lagostins e camarões de água doce e anfípodes), os moluscos (caracóis univalves, amêijoas e mexilhões bivalves) e uma diversidade de insectos (Wetzel, 2001).

## **POLUIÇÃO E CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS**

O desenvolvimento económico, a industrialização e a urbanização em conjunto com o crescimento demográfico, levaram a um aumento significativo do consumo e da contaminação das massas de água (Almeida *et al.*, 2007). Um grande número de rios e aquíferos estão contaminados devido a actividades antropogénicas como a indústria, agricultura e a descarga de efluentes (Koukal *et al.*, 2004; Milovanovic, 2007).

A água de albufeiras é em geral de má qualidade. Contribuem para este facto, não só a composição geológica da bacia, mas também o lançamento de águas residuais urbanas não tratadas e efluentes industriais, assim como a poluição difusa, principalmente devido às práticas agrícolas (Hinck *et al.*, 2007; Milovanovic, 2007).

O tempo de residência das águas nas albufeiras representa mais um factor de risco, para o acumular de contaminantes ambientais, de nutrientes e de organismos fotossintetizadores como cianobactérias, bem como para a depleção do oxigénio dissolvido, aumentando a eutrofização, a turvação da água, e os processos migratórios das espécies do ecossistema aquático da albufeira (Kurunc *et al.*, 2006). Todos estes factores têm efeitos bastante negativos para a biodiversidade e para saúde das populações.

A poluição hídrica pode ser classificada como pontual ou difusa, de acordo com a forma como os poluentes são introduzidos no ambiente aquático e com as actividades ou processos que os geram.

Nas fontes de poluição pontual incluem-se, principalmente, as descargas de águas residuais domésticas e/ou industriais (Tauler *et al.*, 2004).

As descargas de efluentes domésticos são os principais factores responsáveis pela contaminação microbiológica das águas superficiais (Chapman e Jackson, 1996; Mudge e Duce, 2005). O excesso de contaminação fecal, na massa de água superficial, pode trazer impactes negativos para a saúde das populações humana, quando a água é utilizada para fins de consumo, recreativos e de lazer (Reeves *et al.*, 2004). Por outro lado, nas últimas décadas têm vindo a aumentar o número de compostos orgânicos presentes nas águas superficiais uma das muitas razões para que isso aconteça é o uso dessas águas como meio receptor de efluentes (Rodrigues-Moraz *et al.*, 2004). A maioria dos efluentes domésticos e industriais contém uma variedade de poluentes que são transferidos para o meio receptor, uma vez que a remoção deste tipo de contaminantes, nas estações de tratamento, frequentemente é incompleta. Consequentemente, as águas superficiais contêm poluentes dissolvidos, que promovem um impacto negativo no ecossistema aquático, bem como põem em causa as origens de captação de água para abastecimento das populações (Boyd *et al.*, 2003).

As fontes de poluição difusa incluem a poluição de origem agrícola e a poluição veiculada pela atmosfera. A poluição causada pelas actividades agrícolas e industriais é a fonte mais comum de degradação da qualidade da água nos países europeus (Lacorte *et al.*, 2001).

O excessivo aporte de nutrientes (azoto e fósforo) às albufeiras por práticas agrícolas intensas promove quer a acidificação das massas de água, quer a sua eutrofização com o consequente aparecimento de *blooms* de algas e com a depleção de oxigénio, processos que promovem a degradabilidade do meio hídrico (Davis e Koop, 2001; Newham *et al.*, 2004; Laverman *et al.*, 2007).

Os poluentes agrícolas mais comuns associados à poluição difusa são os fertilizantes, a matéria orgânica, os pesticidas e as substâncias tóxicas provenientes das actividades pecuárias (Kolpin *et al.*, 1998; Novotny, 1999; Gunningham e Sinclair, 2005). O aumento de sobrecarga do azoto inorgânico, sob a forma de nitratos, nas albufeiras provém frequentemente da actividade agrícola, das águas residuais e da poluição atmosférica (EPA, 2003; EEA, 2007). Elevados níveis de nitratos nas águas tornam-se tóxicos para humanos e animais, pois nos organismos (principalmente os mais jovens) o nitrato é reduzido a nitrito que promove a oxidação da hemoglobina transformando-a em metahemoglobina o que promove um distúrbio no transporte de oxigénio (Klassen, 2001). A protecção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola está contemplada na Directiva 91/676/EEC (ECC, 1991a). Segundo esta directiva comunitária, massas de água com concentrações de nitratos superiores a 50 mg L<sup>-1</sup> devem ser identificadas como massas de água em risco.

O fósforo não representa um risco directo para os animais e para o homem. A toxicidade causada por fósforo é devida a estimulação, por parte deste, dos *blooms* de algas com a consequente depleção do oxigénio (Vitousek *et al.*, 1997).

Vários estudos têm avaliado a dinâmica e o fluxo destes nutrientes em regiões com forte actividade agrícola e climas semi-áridos, concluindo que as concentrações destes nutrientes apresentam uma variabilidade sazonal, e estão dependentes não só das actividades agrícolas circundantes às albufeiras mas também das características dos sedimentos e do tempo de retenção de cada uma das barragens (Brainwood *et al.*, 2004; Kurunc *et al.*, 2006; Mendiguchía *et al.*, 2007).

No que respeita aos metais, as suas concentrações nas águas superficiais atingiram níveis máximos no espaço europeu durante os anos setenta (Alonso *et al.*, 2004).

Estes compostos inorgânicos podem ser provenientes da estrutura geomorfológica do solo que atravessa a massa de água, ou serem originários de fontes de poluição agrícola ou industrial (Deely e Ferguson, 1994; Micó *et al.*, 2006). O potencial risco ecológico destes compostos para o ecossistema aquático depende da sua especiação química, que afecta a sua absorção e o seu potencial tóxico (Vikaskumar *et al.*, 2007). Os metais pesados tem a capacidade de se acumularem nos tecidos e podem sofrer biomagnificação nas cadeias alimentares (Williams *et al.*, 1994). Alguns estudos têm sido desenvolvidos no sentido de se avaliar a dinâmica deste grupo de substâncias nas massas de água superficiais e quais as suas principais fontes de contaminação. Assim, Micó *et al.* (2006), num estudo na área da província de Alicante (Sul de Espanha) estabeleceram uma correlação entre os metais provenientes de fontes de poluição agrícola e os resultantes das características do solo, e concluíram que nessa região as concentrações de Co, Cr, Fe, Mn, Ni e Zn, na água eram provenientes das características do solo, enquanto as concentrações de Cu, Pb e Cd eram originárias de fontes de poluição agrícola. Fernández *et al.* (2008), num estudo preconizado no Rio Nerbioi-Ibaizabal (País Basco) concluíram que as concentrações detectadas de Al, Cr, Mn e Zn são de origem antropogénica e que algumas das concentrações de metais na água superficial estão correlacionadas com a salinidade, nomeadamente de Cu, Fe e As.

Alguns poluentes orgânicos, como por exemplo os pesticidas são reconhecidos pelo seu impacte negativo no ambiente. No entanto, o risco destas substâncias é extremamente difícil de avaliar pois os efeitos biológicos são pouco conhecidos e a sua presença ocorre em geral a níveis tão baixos que torna difícil a sua determinação analítica (Almeida Azevedo *et al.*, 2000). Apesar de muitos destes poluentes terem sido retirados do mercado, os efeitos da sua aplicação podem ainda estar presentes devido às suas características de bioacumulação, adsorção e persistência ambiental (Leong *et al.*, 2007). Nesta classe de compostos encontram-se a maioria dos pesticidas organoclorados que representam um importante grupo de compostos persistentes com efeitos carcinogénicos, mutagénicos e de desregulação endócrina (Peter *et al.*, 2002).

As condições climáticas específicas para a prática agrícola e o modo de aplicação e composição dos pesticidas devem ser levados em consideração na avaliação do seu risco ecológico, pois estes dois factores são os principais responsáveis pelas vias

de exposição destes compostos (Ramos *et al.*, 2000). Os pesticidas podem ainda ser transformados em subprodutos mais tóxicos e persistentes, através de processos físicos, químicos ou biológicos (Berger, 1998).

A caracterização das águas de superfície, no que respeita aos pesticidas predominantes, é de extrema importância pois a maioria destes compostos é usada de uma forma indiscriminada pelo sector agrícola e possui propriedades intrínsecas com perigosidade para a saúde pública e para o ambiente. Por outro lado a intensificação agrícola, contribui para um agravamento da contaminação por pesticidas e fertilizantes das águas superficiais (Cerejeira *et al.*, 2003; Rodrigues-Moraz *et al.*, 2006).

Ao longo do tempo, por factores inerentes às imposições legais e pela tomada de consciência para a melhoria das práticas agrícolas, a aplicação de pesticidas tem sofrido mudanças. Assim, a utilização de pesticidas persistentes e de difícil degradação, como os organoclorados, tem vindo a ser substituída pelo uso de compostos mais polares e rapidamente degradáveis como por exemplo os metilcarbamatos, os organofosforados e os herbicidas (sulfunilureias, imidazolinonas, triazinas, ácidos clorofenoxi, fenilureias) (Kampioti *et al.*, 2005).

A Comunidade Europeia tem vindo a demonstrar grande preocupação no que concerne à poluição das massas de água por pesticidas, com a aplicação de legislação cada vez mais restrita para a utilização destes compostos e com uma vigilância cada vez mais acentuada. Assim, a Directiva do Conselho 91/414/EEC, de 15 de Julho de 1991 (EEC, 1991b), pretende concretizar a harmonização da homologação dos pesticidas agrícolas nos países da Comunidade e a reavaliação dos pesticidas existentes. Entre os vários objectivos a atingir destacam-se dois: (i) a ponderação dos riscos para a saúde humana, animal e para o ambiente deve ser prioritária em relação à melhoria da produção; e (ii) a tomada de decisão na base do conhecimento científico e técnico com a consequente adopção de elevados padrões de segurança para o homem (utilizadores de pesticidas e consumidores de produtos agrícolas). Por outro lado, a lista de substâncias perigosas prioritárias da Directiva Quadro da Água, encontra-se em final de processo de revisão, assim integrou-se: (i) a adição de oito novos compostos à lista de substâncias perigosas; (ii) a introdução de padrões de qualidade

ambiental (PQA) para cada uma das substâncias que integram a lista das substâncias prioritárias; e (iii) a criação de uma segunda lista que integra substâncias que se encontram sujeitas a processos de avaliação como possíveis substâncias prioritárias (EEC, 2007). Os PQA são caracterizados por dois parâmetros: (i) média anual (MA) que estabelece um limite de protecção em exposições de longo termo; (ii) concentração máxima admissível (CMA) que estabelece um limite de protecção do ecossistema aquático em exposições de curto tempo.

Os PQA propostos para os pesticidas integrados no estudo de avaliação da qualidade da água da albufeira do Alqueva estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Padrões de Qualidade Ambiental ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) propostos para os pesticidas prioritários do presente estudo (ECC, 2007).

Composto	Nº CAS	MA	CMA
Alacloro	15972-60-8	0,3	0,7
Atrazina	1912-24-9	0,6	2,0
Clorpirifos	2921-88-2	0,03	0,1
Diurão	330-54-1	0,2	1,8
Endossulfão*	115-29-7	0,0005	0,004
Isoproturão	34123-59-6	0,3	1,0
Simazina	122-34-9	1	4

MA: média anual; CMA: concentração máxima admissível; \* o endossulfão não foi estudado neste trabalho de investigação, o composto que foi avaliado foi o seu metabolito endossulfão sulfato para o qual não existem valores para os PQA.

Actualmente, na região do Mediterrâneo, vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos para aumentar o conhecimento sobre a evolução e a interacção das várias classes de pesticidas em massas de água superficial (Ramos *et al.*, 2000). Assim, num estudo em águas superficiais e subterrâneas nas regiões de Salamanca e Zamora, onde foram analisados 17 herbicidas, verificou-se que a contaminação por este tipo de pesticidas está correlacionada com as práticas agrícolas das áreas circundantes.

Nesse estudo o composto mais frequentemente detectado e em maiores concentrações foi o clorotolurão (Carabias-Martínez *et al.*, 2003). Claver *et al.* (2006) observaram na bacia hidrográfica do Rio Ebro (Espanha), que a classe de triazinas foi a mais frequentemente detectada, seguida dos organofosforados e com uma menor extensão dos organoclorados. Nesse estudo, os autores concluíram que o clorpirifos foi o organofosforado que foi detectado em concentrações mais elevadas relacionando esse facto com a sua intensa aplicação em campos de fruticultura. Garmouma *et al.* (1998) observaram a variação sazonal de triazinas e fenilureias na bacia hidrográfica do Rio Marne (França), após a sua aplicação nas culturas. As quantidades de triazinas detectadas na água foram superiores às quantidades de fenilureias no mesmo período de avaliação. Em concordância com os resultados anteriores, Albanis *et al.* (1998) concluíram que a poluição da água superficial e subterrâneas no Imathia (Grécia) é promovida principalmente por triazinas e cloroacetanilidas.

Em Portugal e para a implementação da Directiva 76/464/CEE (ECC, 1976), foi necessário avaliar quais as principais substâncias prioritárias existentes nas águas portuguesas. Neste contexto, verificou-se que, dos 115 compostos semi-voláteis descritos na directiva, 19 eram poluentes relevantes nas águas Portuguesas. Assim, estes compostos (maioritariamente pesticidas: simazina, tributilfosfato, ácido 2-metil-clorofenoxiacético (MCPA), ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D), atrazina, bentazona, diclopropil, pentaclorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), 2,4,6-triclorofenol, mecoprop, alacloro, metolacloro, 3-clorofenol, linurão, dimetoato, 4-clorofenol) devem ser integrados em futuros programas de avaliação da qualidade de massas de água (Lacorte *et al.*, 2001).

Por outro lado vários estudos têm sido desenvolvidos nas principais bacias hidrográficas Portuguesas. Num dos primeiros estudos realizado em Portugal, onde foram avaliados 75 compostos em 43 estações de amostragem, as triazinas foram os pesticidas mais frequentemente detectados, sendo a atrazina o pesticida quantificado em maiores concentrações. Dos locais amostrados Monte da Vinha (Bacia Hidrográfica do Guadiana) apresentou as concentrações mais elevadas para a maioria dos compostos analisados (Almeida Azevedo *et al.*, 2000).

Cerejeira *et al.* (2003), num estudo nas principais bacias hidrográficas com influência agrícola, Bacia Hidrográfica do Tejo, Guadiana e Sado, concluíram que os pesticidas mais frequentemente detectados foram lindano, hexaclorobenzeno, heptacloro, aldrina,  $\alpha$ - e  $\beta$ -endossulfão, atrazina, simazina.

## **AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO E TOXICIDADE DAS MASSAS DE ÁGUA DE ALBUFEIRAS**

Actualmente, a problemática da qualidade da água é abordada sob duas vertentes principais. A primeira prende-se com a qualidade da água no meio natural, ou seja, nas diferentes massas de água superficiais e subterrâneas. A segunda vertente de análise diz respeito às várias utilizações que se fazem dos recursos hídricos, e à avaliação da adequação da qualidade da água para essas mesmas utilizações (Decreto-Lei nº 112/2002).

O desenvolvimento de programas de avaliação dos sistemas aquáticos é imprescindível para o controlo da qualidade da água, uma vez que é necessário ter conhecimento do grau de poluição, com o objectivo último de avaliar o seu impacto na massa de água e proceder a processos de remediação para melhorar a qualidade para os diversos fins (Almeida *et al.*, 2007). Os principais objectivos dos programas de avaliação são: (i) evitar a deterioração dos ecossistemas aquáticos, para proporcionar águas com qualidade suficiente para serem utilizadas em múltiplos fins, nomeadamente consumo, irrigação e fins recreativos; (ii) evitar a contaminação a jusante promovida por poluentes vertidos a montante; (iii) avaliar o grau de contaminação e de toxicidade que pode advir para as espécies que integram o ecossistema aquático e para o homem (Boyacioglu, 2006; Iscen *et al.*, 2008).

No que respeita, aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos que integram os programas de avaliação da qualidade de águas superficiais, estes encontram-se legislados no Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto, adaptado da Directiva Comunitária 75/440/CE que estabelece as normas, critérios e objectivos de

qualidade no que respeita a águas superficiais destinadas ao consumo humano, rega e actividades recreativa (ECC, 1975).

Dos parâmetros físico-químicos fazem parte: (i) parâmetros indicadores da estratificação sazonal da massa da água - pH, temperatura e oxigénio dissolvido; (ii) parâmetros indicadores de mineralização - condutividade, cálcio, sódio, magnésio (parâmetros responsáveis pela dureza da água), alcalinidade, cloretos e sólidos dissolvidos totais; (iii) nutrientes – compostos que integram o ciclo do azoto e do fósforo; (iv) descritores orgânicos - parâmetros indicadores da presença de matéria orgânica como a carência bioquímica de oxigénio ao 5º dia (CBO<sub>5</sub>), carência química de oxigénio (CQO), carbono orgânico total (COT) e oxidabilidade; (v) elementos metálicos; (vi) substâncias perigosas – metais pesados e pesticidas.

Os parâmetros microbiológicos integram microorganismos indicadores da presença de contaminação fecal: coliformes fecais; enterococos fecais; presença *Salmonella sp*, que pode limitar o uso da água, nomeadamente para fins recreativos e a sua possível utilização para consumo humano.

A avaliação físico-química e microbiológica da massa de água tem-se tornado cada vez mais insuficiente para o controlo integrado da qualidade da água e do estado ecológico do ecossistema aquático. Esta avaliação deve ser complementada, por parâmetros ecológicos e ecotoxicológicos (Okamura *et al.*, 1996). A Directiva Lei-Quadro da Água (ECC, 2000) reforça a necessidade de implementar a avaliação ecológica recorrendo a vários *endpoints* tais como, a composição e abundância de invertebrados bentónicos, plantas aquáticas ou fauna piscícola. Assim, a avaliação do “bom estado ecológico”, preconizado pela Directiva Quadro da Água baseia-se quer na caracterização da estrutura das comunidades do ecossistema em estudo, nomeadamente de macroinvertebrados bentónicos quer no cálculo de índices bióticos (Rosenberg e Resh, 1993), o que permite ultrapassar as limitações impostas pelos parâmetros físico-químicos que não permitem quantificar senão os efeitos instantâneos das pressões das actividades humanas sobre os meios hídricos, não determinando o impacto biológico da poluição (Soldán, 2003; Donohue *et al.*, 2006). As comunidades aquáticas traduzem as condições ambientais verificadas durante um período de tempo alargado, reflectindo as condições críticas que poderão ter ocorrido durante esse período.

No entanto, apesar deste tipo de avaliação ter sido utilizado, com resultados positivos, para avaliação de poluição por matéria orgânica, acidificação e modificação de fluxos hidrológicos de massas de água (Bonada *et al.*, 2006), não é eficiente para a avaliação do impacto ecológico de poluentes e das interações entre o meio biótico e abiótico. Este tipo de interações pode ser avaliado se for integrada na avaliação a análise (eco)toxicológica (van Straalen e Gestel, 2008).

Assim, enquanto os parâmetros químicos permitem identificar quais os factores que promovem o efeito, o uso dos ensaios ecotoxicológicos permite avaliar as causas do dano ecológico (Soares, 1989; Crane *et al.*, 2007; Wharfe *et al.*, 2007)

Os ensaios ecotoxicológicos têm como objectivo estudar a variação dos efeitos subletais e letais em populações de diferentes zonas geográficas, os efeitos de exposições prolongadas de baixas doses de poluentes nos ecossistemas, as interações entre poluentes e dos poluentes com variáveis ambientais, como por exemplo, a temperatura, a salinidade e pressão atmosférica (Baird, 1999; Hoffman *et al.*, 2003).

Os pressupostos atrás referidos permitem salientar o acesso aos ensaios ecotoxicológicos como ferramenta imprescindível na avaliação de risco ambiental e para a saúde humana (Ohe *et al.*, 2004).

A avaliação ecotoxicológica pode integrar ensaios de exposição aguda e/ou crónica consoante o que se pretende analisar. Assim, a avaliação toxicológica aguda é preconizada por ensaios de curta duração com parâmetros de avaliação como imobilidade, mortalidade, luminescência (Klaassen, 2001; Hoffman *et al.*, 2003). Estes ensaios são considerados, pela maioria dos autores, como métodos de *screening* em avaliação toxicológica (Guilhermino *et al.*, 2000; Latif e Licek, 2004). A avaliação toxicológica crónica é realizada recorrendo a ensaios que integram as várias etapas do ciclo de vida do organismo-teste. A avaliação dos efeitos é realizada recorrendo a *endpoints* como taxa de reprodução, crescimento, frequência de mudas e malformações embrionárias (Hoffman *et al.*, 2003).

A caracterização ecotoxicológica em albufeiras deve permitir identificar quando e como é que as comunidades aquáticas estão a ser afectadas pelos poluentes e permitir a determinação de margens de segurança (Forget-Leray *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2003; Hernando *et al.*, 2007). Para isso, é necessário implementar bioensaios representativos das várias espécies taxonómicas (bactérias, algas, plantas, crustáceos, insectos e peixes) e dos vários grupos funcionais (decompositores, produtores primários, consumidores primários e secundários).

Os ensaios com bactérias permitem avaliar o efeito de poluentes ou amostras ambientais em propriedades bioquímicas, como actividade enzimática (ATPase), alterações na mobilidade (*Spirillum volutans*), inibição da emissão de luz (*Vibrio fisheri*) e viabilidade celular (*Pseudomonas putida*) (Girotti *et al.*, 2008; García-Ripoll *et al.*, 2009). Por outro lado, os ensaios com algas, para além de serem utilizados na avaliação de poluentes ambientais, permitem ainda a caracterização de condições de oxigénio, luz, temperatura e de nutrientes da massa de água, através da determinação da inibição do crescimento (ex. *Pseudokirchneriella subcapitata*) (Mendonça *et al.*, 2009). As plantas vascularizadas são usadas para caracterizar o impacto de determinados poluentes na flora do ecossistema aquático (ex. *Lemna minor*) (Gorzerino *et al.*, 2009; Mendonça *et al.*, 2009). Os invertebrados aquáticos (consumidores primários) ocupam uma posição chave na cadeia alimentar do ecossistema aquático, pois são o alimento maioritário dos peixes e alimentam-se de algas, daí a sua importância no controlo da qualidade da água (Dodson e Hanazato, 1995). Os bioensaios com invertebrados aquáticos englobam, entre outros, ensaios com os crustáceos *Daphnia sp* e *Thamnocephalus platyurus* (Nałecz-Jawecki *et al.*, 2007; Rouvalis *et al.*, 2009). Na avaliação ecotoxicológica aquática os peixes são um elo de ligação com os humanos pois são vertebrados e consequentemente partilham muitas similaridades fisiológicas (Breitholtz *et al.*, 2006). Para além disso, representam os consumidores secundários e terciários na cadeia alimentar do ecossistema aquático e tornam-se alimento para os humanos, podendo sofrer processos de bioacumulação e biomagnificação de poluentes com características lipofílicas (Jonsson e Toledo, 1993; Nowak *et al.*, 1995). Todos estes organismos são utilizados para avaliar a função habitat da massa de água, ou seja, a sua qualidade ecológica.

Os ensaios ecotoxicológicos têm sido aplicados com sucesso em vários meios e amostras ambientais tais como efluentes (Latif e Licek, 2004; Sotero-Santos *et al.*, 2005; Pandard *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2006), sedimentos (Martinez-Madrid *et al.*, 1999; Larh *et al.* 2003; Latif e Licek, 2004; Delistraty e Yokel, 2007; Antunes *et al.*, 2007), águas superficiais e subterrâneas (Okamura *et al.*, 1996; Diaz-Baez *et al.*, 2002; Mankiewicz-Boczek *et al.*, 2008) e têm sido usados como etapa imprescindível para avaliação do risco ambiental (Antunes *et al.*, 2007). No que respeita à avaliação da qualidade da água superficial, com acesso a ensaios ecotoxicológicos Okamura *et al.* (1996) utilizaram uma bateria de cinco testes ecotoxicológicos para avaliar a toxicidade de rios e lagos do Japão e concluíram que a *Daphnia sp* foi das espécies usadas a mais sensível. Num estudo realizado no Canadá, para avaliação toxicológica de águas para consumo, verificou-se que das três espécies utilizadas (*Daphnia magna*, *Hydra attenuata*, *Lactuca sativa*) a *H. attenuata* foi a mais sensível e que, na maioria das amostras, as análises químicas corroboraram os resultados ecotoxicológicos (Diaz-Baez *et al.*, 2002). Um estudo, realizado nos rios de Fez e Sebou (Marrocos) rios bastante poluídos por metais e pesticidas, evidenciou a eficácia da avaliação integrada dos ensaios ecotoxicológicos com os ensaios químicos. Neste estudo o organismo teste mais sensível foi a alga *P. subcapitata* (Koukal *et al.*, 2004). Ozmen *et al.* (2008) quantificaram biomarcadores em peixes, tais como glutathione-S-transferase, lactato desidrogenase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, na avaliação do grau de contaminação por organoclorados numa barragem na Turquia. Latif e Licek (2004), na avaliação de amostras de água do Rio Traun (Áustria) através do uso de uma bateria de seis microbiotestes (Algaltoxkit<sup>®</sup>, Higher Plant Microbiotest<sup>®</sup>, Daphtoxkit<sup>®</sup>, Thamnotoxkit<sup>®</sup>, Ostracodtoxkit<sup>®</sup>) observaram que o organismo mais sensível foi o crustáceo *T. platyurus*, estes autores fazem ainda referência à necessidade dos resultados obtidos nos ensaios de curta exposição serem confirmados por ensaios crónicos. Mankiewicz-Boczek *et al.* (2008) aplicaram um conjunto de microbiotestes na avaliação de alguns dos rios mais poluídos da Polónia, e concluíram que o Algaltoxkit<sup>®</sup> (*P. subcapitata*) foi o teste mais sensível, seguido dos ensaios com *L. minor* e com *T. platyurus*.

Takenaka *et al.* (2006) observaram que os compostos à base de cloro que se utilizam no processo de desinfecção da água para consumo humano são tóxicos, a curto e longo prazo, para alguns crustáceos, para além de ocasionarem a formação de trihalometanos que representam um grave problema de saúde pública. Mattei *et al.* (2006) avaliaram o efeito tóxico promovido por dois dos desinfectantes mais utilizados nas estações de tratamento de água (hipoclorito de sódio, dióxido de cloro), tendo verificado que ambos os compostos promoveram toxicidade aguda ( $EC_{50}$  de 0,04 e 0,03  $mg L^{-1}$ , respectivamente) e crónica (NOEC 0,014 e 0,008  $mg L^{-1}$ , respectivamente) no organismo teste (*D. magna*) em concentrações muito abaixo do permitido pela legislação, como garantia de barreira sanitária 0,2-0,6  $mg L^{-1}$  (Decreto-Lei nº 306/2007). Estes autores, salvaguardam a necessidade de utilização de outros compostos ou outros processos de desinfecção para reduzir/eliminar o risco ambiental da aplicação dos compostos de cloro.

## O CASO DE ESTUDO DA ALBUFEIRA DO ALQUEVA

O caso de estudo deste trabalho de investigação é a albufeira do Alqueva. Esta albufeira é a maior da Europa, fica situada no sul de Portugal e constitui uma reserva estratégica de água na Bacia Hidrográfica do Guadiana.

As primeiras referências à necessidade de criar uma grande barragem no rio Guadiana datam de há pelo menos 100 anos e, embora o projecto tenha sido desenvolvido em 1957 a sua construção só foi concluída em 2002. Na região do Alentejo, o planeamento hidráulico baseou-se, fundamentalmente, na construção de aproveitamentos hidroagrícolas, face à existência de zonas planas e de solos com boa aptidão para o regadio. Foi com o Plano de Rega do Alentejo que, pela primeira vez, se encarou a utilização dos recursos hídricos do Guadiana, em regime de fins múltiplos. É neste contexto que surge o Empreendimento de Fins Múltiplos de Alqueva.

Este empreendimento tem como principal objectivo a obtenção de uma reserva significativa de água para uso em diversos fins: (i) actividades agrícolas; (ii) consumo urbano e industrial; (iii) produção de energia eléctrica; (iv) regularização dos caudais do rio Guadiana (Decreto-Regulamentar nº 16/2001).

Para além das utilizações principais, estão também criadas as condições para a prática de actividades recreativas, e a construção nos terrenos circundantes de casas de veraneio, estabelecimentos hoteleiros e parques de campismo. Tornou-se assim necessário regulamentar o exercício das actividades secundárias que podem ser proporcionadas pela albufeira (pesca, banhos, navegação recreativa a remo e a vela, navegação a motor, competições desportivas). Assim, segundo o Decreto Regulamentar nº 2/88, de 20 de Janeiro, a albufeira de Alqueva é classificada como uma albufeira protegida, ou seja, cujo água é ou se prevê que venha a ser utilizada para abastecimento de populações e ainda cuja protecção é ditada por razões de defesa ecológica. Cada actividade secundária apresenta um índice de utilização. No caso da albufeira do Alqueva, a actividade “Banhos e Natação” apresenta um índice de utilização igual a 1, o que quer dizer que são actividades permitidas com restrição, ou seja, que podem ser limitadas ou suspensas quer por razões de defesa contra a poluição ou contaminação das águas, quer por razões de saúde dos próprios utentes.

Dado que as massas de água das albufeiras são o reflexo das actividades e alterações que ocorrem na respectiva bacia hidrográfica (Thornton *et al.*, 1996), é necessário descrever as características geográficas, físicas e sócio-económicas da Bacia Hidrográfica do Rio Guadiana.

Assim, a albufeira do Alqueva situa-se na Bacia Hidrográfica do Rio Guadiana, que abrange uma superfície total de 66 800 Km<sup>2</sup>, dos quais 55 220 Km<sup>2</sup> (83%) em território Espanhol e 11 580 Km<sup>2</sup> (17%) em território Português. A população total residente ascende a 1,9 milhões de habitantes, dos quais 230 mil habitantes em Portugal. A Bacia nacional do Guadiana encontra-se delimitada a norte pela Bacia do Tejo, a sul pelas pequenas ribeiras do Algarve, a este pela fronteira e a oeste pelas Bacias do Tejo, Sado, Mira e Arade, estendendo-se pelas unidades morfoestruturais correspondentes ao maciço antigo e à orla meridional algarvia (Decreto-Regulamentar nº 16/2001).

Sob o ponto de vista climático, a bacia é bastante homogénea, com características mediterrâneas. Os Verões são quentes com alta insolação e elevada evapotranspiração, enquanto os Invernos são relativamente rigorosos. A temperatura média anual é próxima de 16°C. Nos meses mais quentes (Julho/Agosto) a temperatura média varia entre 24°C e 28°C, nos meses mais frios a temperatura média varia entre 8,5 e os 11°C. A precipitação média anual ponderada sobre a bacia é de 550 mm, variando entre 450 mm, nas zonas de Mértola e Moura, e um valor médio ligeiramente superior a 1000 mm nas cabeceiras do Ardila, Odeleite, e Caia. No que se refere à distribuição mensal da precipitação, toda a bacia é afectada por um período estival com ausência quase total de chuva. Em média, mais de 80% do total anual da precipitação ocorre entre Outubro-Abril (período húmido) (WWFN, 1995; Decreto-Regulamentar n° 16/2001).

No que respeita à biodiversidade, a região do Alentejo está incluída na bacia do Mediterrâneo, que é uma das 25 regiões com maior biodiversidade, onde se encontram 44% do total das plantas vasculares conhecidas e 35% das espécies de vertebrados (Myers *et al.*, 2000).

Assim, as comunidades fitoplanctónicas mais importantes são as Bacilariofícias e as Clorofícias. Estas espécies são características de águas muito produtivas e eutróficas (WWFN, 1995). Em relação ao zooplanton, a região é caracterizada por um número limitado de espécies, onde predominam os Rotíferos e os Crustáceos. De uma forma geral, o aumento dos sólidos orgânicos transportados pelo rio, contribui para o aumento de filtradores não selectivos, como Cladóceros e Rotíferos. As principais macrófitas existentes no rio Guadiana são herbáceas. As coberturas aquáticas mais significativas incluem as espécies *Potamogeton crispus* (folhas flutuantes), *Najas minor*, *Myriophyllum spicatum* (submersa) (Cortes *et al.*, 1996; SEIA, 1995). Dos macroinvertebrados mais importantes no rio Guadiana encontram-se várias espécies de moluscos, destacando-se o lagostim-vermelho (*Procambarus clarkii*). No que respeita aos insectos, a sua composição é essencialmente de Chironomidae (Ordem Díptera) (WWFN, 1995). A ictiofauna inclui espécies como tainha, perca-sol (*Lepomis gibbosus*), barbo (*Barbus steindachneri*; *Barbus comiza*),

achigã (*Micropterus salmoides*), carpa (*Cyprinus carpio*), gambusia (*Gambusia holbrooki*) (WWFN, 1995; SEIA, 1995).

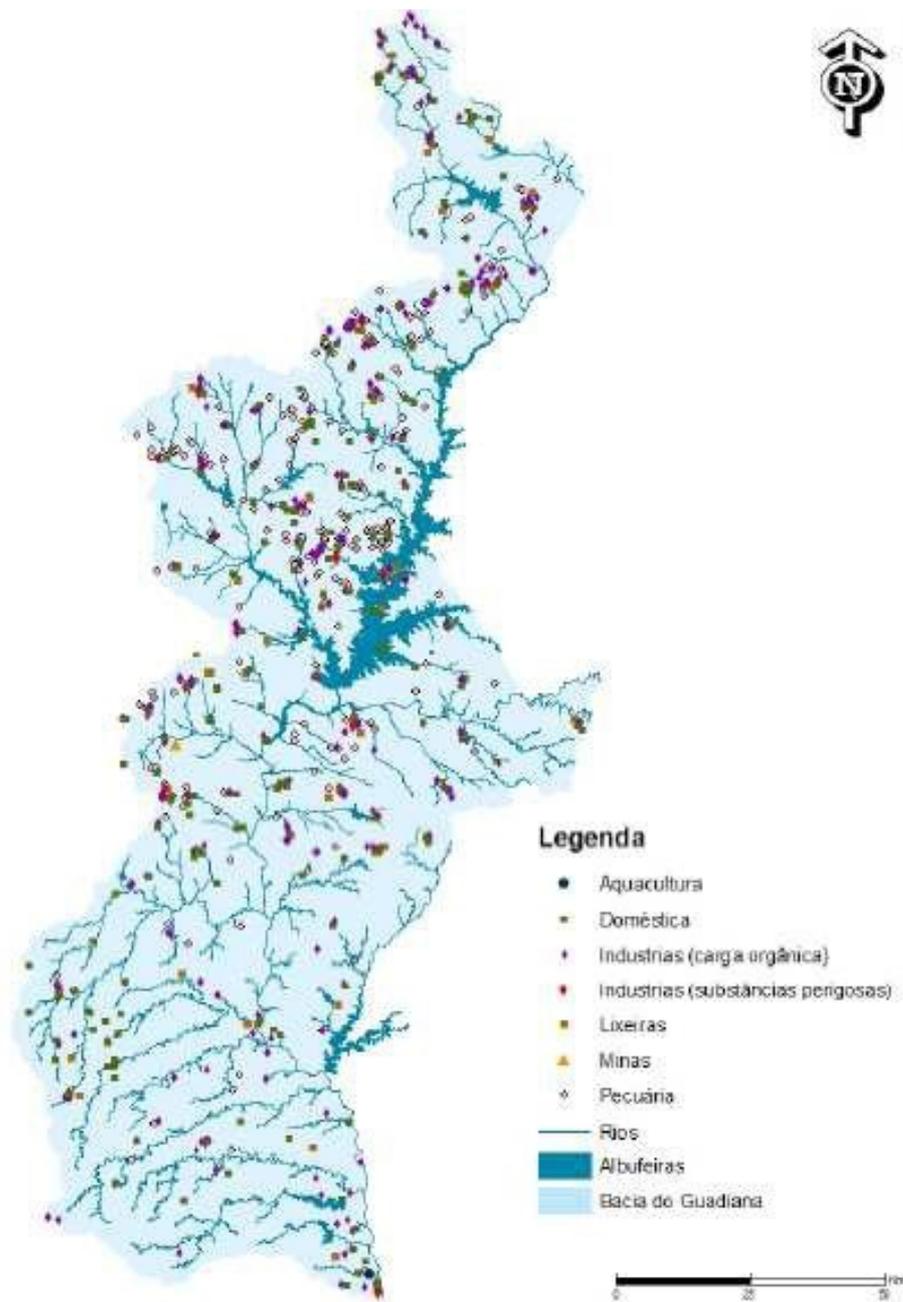
Segundo o Decreto Regulamentar nº 16/2001 de 5 de Dezembro, que aprova o plano de Bacia Hidrográfica do Guadiana, a evolução da qualidade da água nos últimos anos mostra, se exceptuarmos a utilização da água para rega, a quase geral inadequação da qualidade da água presente nesta bacia hidrográfica para os diversos usos actuais ou pretendidos, quando considerados os critérios estabelecidos pela legislação em vigor.

A poluição da água da Bacia Hidrográfica do Rio Guadiana é devida a factores de origem natural e antropogénica (Morales, 1993). Assim, a Bacia está sob influência do clima Mediterrâneo (acima mencionado), o que se traduz na variação marcada do fluxo natural das linhas de água durante o ano, e de ano para ano, como resultado da variação sazonal e das flutuações anuais da precipitação (Chícaro *et al.*, 2006). Conjuntamente, com a variação natural do fluxo do rio, o aumento do desenvolvimento económico e urbano nas margens da bacia principalmente a partir de 1950, tem progressivamente reduzido a quantidade e a qualidade da água (Chícaro *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2004).

As principais fontes de poluição tóxica na bacia portuguesa são os aglomerados urbanos, as suiniculturas e os lagares de azeite (IA, 2005). As explorações de suinicultura encontram-se espalhadas por toda a bacia, com maior incidência nas regiões de Borba, Redondo, Reguengos de Monsaraz, Elvas e Moura. A maioria das suiniculturas e boviniculturas referenciadas (85%) descarrega os seus efluentes para linhas de água ou para o solo, sem tratamento prévio (PROCESL, 2003). Assim, destas unidades, resulta a descarga para meio receptor de grandes quantidades de matéria orgânica, nutrientes e elevados teores bacterianos. Os lagares de azeite mais representativos estão localizados nos concelhos de Arronches, Portalegre, Campo Maior, Serpa e Moura (SEIA, 1995). Dos lagares de azeite referenciados 34% descarregam os seus efluentes para o meio hídrico ou para o solo, sem tratamento prévio (PROCESL, 2003). Os efluentes dos lagares de azeite são caracterizados por um pH muito reduzido, com elevados teores de matéria orgânica, óleos e fenóis. A acrescentar a estas fontes existe ainda a poluição tóxica, proveniente de minas abandonadas, nas regiões de Campo Maior, Alandroal, S. Domingos (Fig. 4).

Os principais poluentes quantificáveis na bacia, e provenientes de fontes pontuais, são o fósforo, o azoto, a matéria orgânica, o mercúrio, o chumbo, o arsénio, o antimónio, o benzo(b)fluorentano, o 1,2,4,5-tetraclorobenzeno e compostos de tributil estanho (IA, 2005).

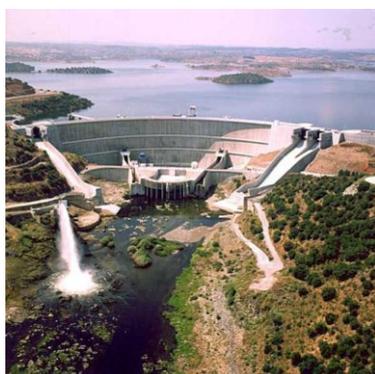
No que respeita à poluição difusa a principal actividade responsável por esta é a agricultura resultante de práticas fitossanitárias e de adubação de culturas, nas regiões de Campo Maior, Elvas, Redondo, Reguengos, Borba, Mourão e Vidigueira. Os principais poluentes identificados, provenientes de fontes difusas, são o azoto, fósforo, alacloro, atrazina, lindano, hexaclorobenzeno, hexaclorociclohexano, metoalcloro e 3,4-dicloroanilina (IA, 2005). Para além dos factores mencionados, a Bacia do Guadiana recebe a água da rega de 3000 Km<sup>2</sup> de terras agrícolas, bem como os efluentes domésticos e industriais de mais de 1 650 000 habitantes provenientes de Espanha (PROCESL, 2003). Todos estes factores podem promover uma forte variabilidade da qualidade da água da albufeira do Alqueva em termos espaciais e temporais.



**Figura 4.** Fontes de poluição difusa e pontual, referenciadas na área circundante da albufeira do Alqueva (adaptado de Terceiro *et al.*, 2008)

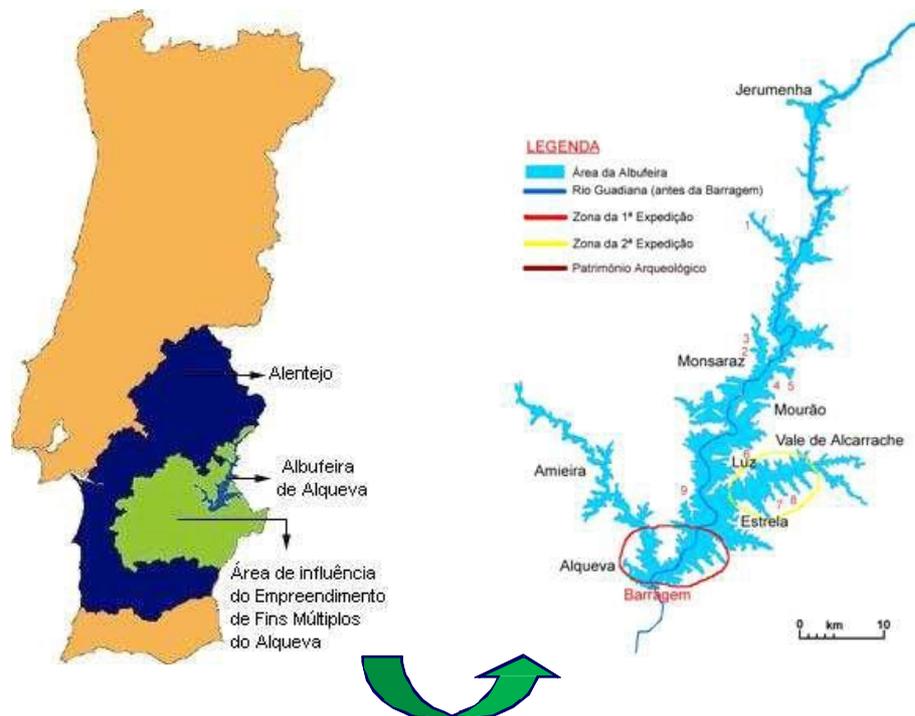
Entre as principais componentes infra-estruturais deste projecto, fazem parte a Barragem do Alqueva, a Barragem e Central de Pedrógão, a estação Elevatória dos Álamos, e um conjunto de infra-estruturas que compõem o Sistema Global de Rega onde se incluem mais 17 barragens, 680 Km de canais da rede primária, 18 estações elevatórias principais, 6 pequenas centrais hídricas, 96 depósitos de regularização, 96 estações elevatórias secundárias, cerca de 4 000 km de condutas da rede secundária de Rega e perto de 10 000 hidrantes, abrangendo uma área com cerca de 110 000 ha.

A barragem do Alqueva apresenta 96 m de altura máxima, tem 458 metros de desenvolvimento, é do tipo “abóbada de dupla curvatura” em betão e está equipada com 3 descarregadores de meio fundo com a capacidade para 1 750 m<sup>3</sup>/s cada, e uma descarga de fundo com capacidade para 160 m<sup>3</sup>/s. A capacidade total de reservatório criado por esta barragem à cota máxima de 152 metros é de 4 150 hm<sup>3</sup>. Destes, 3 150 hm<sup>3</sup> constituem o seu volume útil, um volume que permite a normal exploração do empreendimento durante os períodos de seca cíclica que assolam o Alentejo (Fig. 5) ([www.edia.pt/portal/](http://www.edia.pt/portal/), acedido a 20 Março 2008).



**Figura 5.** Paredão e Caudal Ecológico da Barragem de Alqueva (adaptado de [www.edia.pt/portal/](http://www.edia.pt/portal/), acedido a 4 Fevereiro 2009).

A albufeira estende-se por 83 quilómetros ao longo dos concelhos portugueses de Moura, Portel, Mourão, Reguengos de Monsaraz e Alandroal e espanhóis de Vila Nueva del Fresno, Chelles, Alconchelles, Badajoz e Olivença, criando um lago com 250 Km<sup>2</sup> de superfície e 1 160 Km de margens (Fig. 6) (www.edia.pt/portal/, acedido a 20 Março 2008).



**Figura 6.** Localização da albufeira do Alqueva (adaptado <http://www.edia.pt/portal/> acedido a 20 Março 2008).

## OBJECTIVOS DO ESTUDO

Este estudo tem como objectivo a avaliação integrada da qualidade da água da albufeira do Alqueva, bem como a identificação de possíveis compostos tóxicos para o ecossistema aquático e para a saúde da população. Para responder ao objectivo proposto foram preconizados uma série de ensaios com a finalidade de:

- (i) caracterizar a qualidade da água da albufeira do Alqueva como recurso hídrico para a região do Alentejo;
- (ii) avaliar o potencial toxicológico da massa de água e identificar potenciais efeitos resultantes de factores de *stress* no ecossistema aquático;
- (iii) identificar e avaliar a dinâmica de pesticidas que possam ser potenciais factores de *stress* na albufeira.

## **CAPÍTULO I**

### **CARACTERIZAÇÃO INTEGRADA DA QUALIDADE DA ÁGUA DA ALBUFEIRA DO ALQUEVA: PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS E SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS**



## Resumo

A albufeira do Alqueva está localizada na região Sul de Portugal e constitui o maior lago artificial da Península Ibérica. A albufeira foi preconizada para integrar uma importante zona turística e uma reserva estratégica de água quer para abastecimento às populações quer para uso na actividade agrícola. O objectivo deste estudo foi avaliar os parâmetros que mais influenciam a variabilidade da qualidade da água da albufeira, bem como relacioná-los com as variações temporais e espaciais observadas. A avaliação da qualidade da água foi realizada em nove estações de amostragem, ao longo da linha de água, durante um período de 18 meses (Janeiro 2006 a Junho de 2007). Foram quantificados 26 parâmetros de qualidade de água: pH, temperatura, redox, oxigénio dissolvido, carência química de oxigénio, carência bioquímica de oxigénio, nitritos, nitratos, azoto kjeldahl, azoto amoniacal, fósforo total, cloretos, carbono orgânico total, oxidabilidade, coliformes totais, enterococos fecais, atrazina, simazina, terbutilazina, metoalocloro, clorpirifos, endossulfão sulfato, ferro, manganês e arsénio. De acordo com o Decreto-Lei nº 236/98, alguns parâmetros quantificados, tais como, a carência química de oxigénio, carência bioquímica de oxigénio, o azoto amoniacal, o fósforo total, os coliformes totais, os enterococos fecais, o ferro, o manganês e o arsénio, encontravam-se acima dos valores legislados, em alguma das amostragens realizadas. A aplicação da análise de *cluster* permitiu a obtenção de cinco *clusters* construídos com as várias amostras dos diferentes locais de amostragem, reflectindo diferenças de qualidade da água em diferentes localizações do sistema. A análise de componentes principais identificou seis varifactores responsáveis por 64 % do total da variância da qualidade da água. Os principais parâmetros que explicam a variabilidade da qualidade da água foram o fósforo total, a oxidabilidade, o ferro e os herbicidas parâmetros cuja elevada concentração indica contaminação por fontes antropogénicas. Os locais mais influenciados por nutrientes e descritores orgânicos foram Sra. Ajuda e Ardila, enquanto os mais influenciados por herbicidas foram Álamos e Sra. Ajuda.

## I.1. Introdução

As albufeiras podem ser poluídas por uma série de substâncias perigosas através de descargas provenientes de actividades industriais e agrícolas, bem como da lixiviação dos solos (Donhue *et al.*, 2006). A poluição com substâncias perigosas e os processos de eutrofização pelo excesso de nutrientes nas massas de água são tópicos de considerável interesse, devido ao aumento do número dessas substâncias quantificadas nas águas, bem como às directrizes traçadas pela União Europeia no que respeita à protecção dos recursos hídricos para a produção de água para consumo (Rodríguez-Moras *et al.*, 2006). As albufeiras são construídas para responder a diversos fins como: (i) fontes estratégicas de reserva de água para reforço ao abastecimento de populações; (ii) aplicação de água nas actividades agrícolas; e (iii) produção de energia eléctrica. Estes usos estão dependentes da qualidade da água, que deve ser mantida dentro de determinados limites (Isçen *et al.*, 2008). Neste contexto para reduzir o risco ambiental é crucial estabelecer programas de caracterização da qualidade de água superficial, bem como identificar e conhecer a dinâmica dos poluentes ambientais detectados na massa de água e as suas fontes de poluição principais (Koukal *et al.*, 2004; Ouyang *et al.*, 2006).

Os programas de caracterização da massa de água produzem uma enorme quantidade de dados difíceis de interpretar. Este problema pode ser reduzido através da aplicação de métodos de estatística multivariados. A análise de *clusters* (ACL) e a análise de componentes principais (ACP) têm sido bastante utilizadas para a avaliação dos parâmetros de qualidade, pois são métodos imparciais que nos indicam associações entre amostras e/ou variáveis (Wenning e Erikson, 1994). Estas associações baseadas na similaridade de magnitudes ou variações nos constituintes químicos e físicos podem indicar a presença de influências sazonais ou espaciais causadas por factores naturais e antropogénicos (Vega *et al.*, 1998; Wunderline *et al.*, 2001; Helena *et al.*, 2000; Simeonova *et al.*, 2003; Simeonov *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004, 2005; Shrestha e Kazama, 2007; Yidana *et al.*, 2008).

Esta metodologia estatística tem sido utilizada em variados estudos de avaliação da qualidade da água por vários autores (Chapman, 1992; Vega *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 1999; Helena *et al.*, 2000; Simeonov *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Iscen *et al.*, 2008).

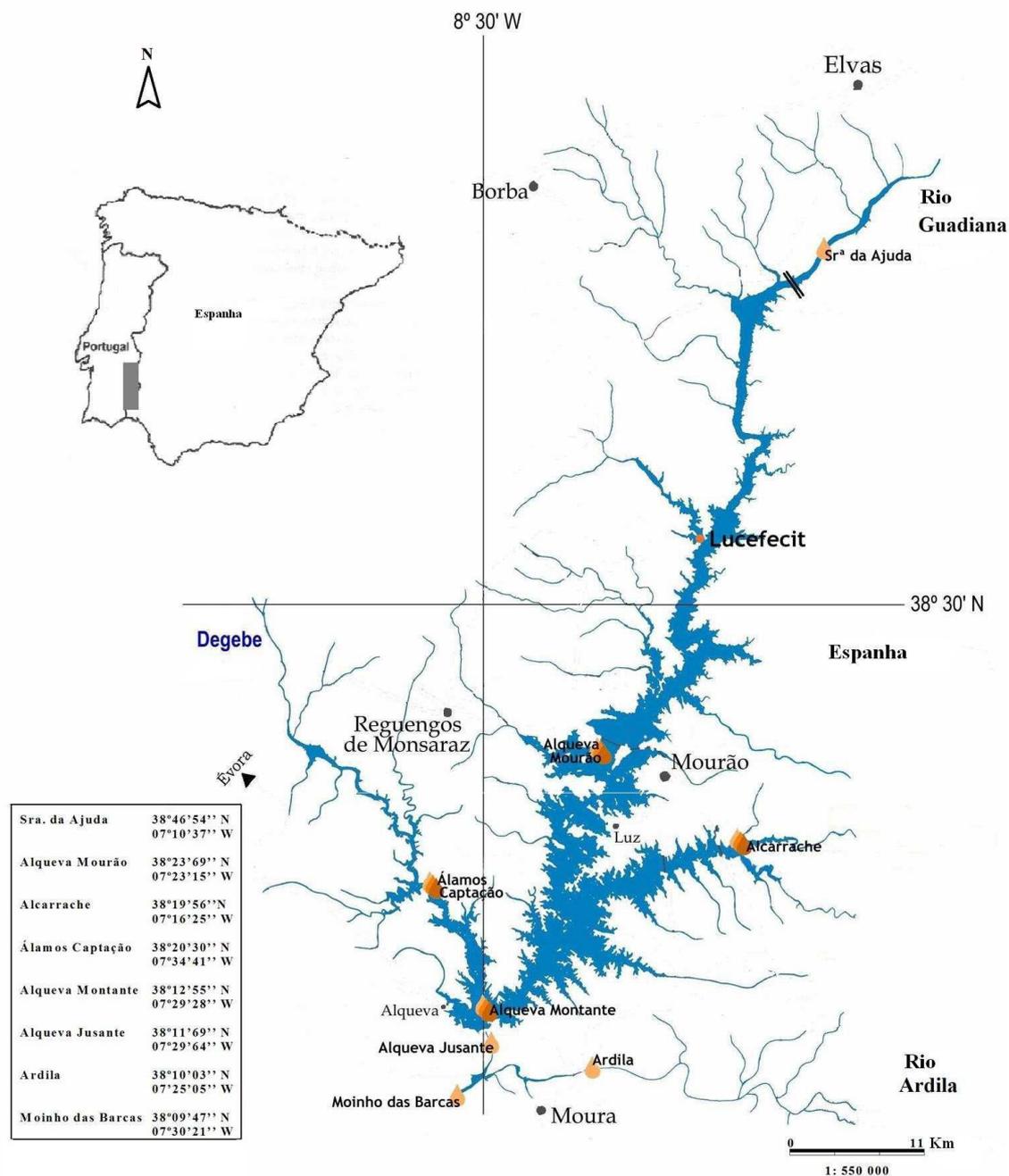
O objectivo deste estudo é a avaliação da dinâmica dos parâmetros mais relevantes na variabilidade da qualidade da massa de água da albufeira do Alqueva, assim como, a sua relação com as principais fontes de poluição antropogénica do ecossistema em estudo.

## **I.2. Material e Métodos**

### **I.2.1. Área de Estudo**

Na avaliação da qualidade da água na albufeira de Alqueva, foram definidos nove locais de amostragem (Fig. I.1):

As nove estações de amostragem permitem uma avaliação da qualidade da água nas vertentes de entrada de fluxo de água, ou seja, afluente à albufeira ((Sra. Ajuda (Aj), Alcarrache (Ac), Lucefecit (Lf) e Ardila-confluência (Ar)); na albufeira (Álamos-Captação (Al); Alqueva-Mourão (Mr); Alqueva-Montante (Mt)); e a jusante da albufeira ((Alqueva-Jusante (Jz); Moinho das Barcas (Mb))



**Figura I.1.** Localização das estações de amostragem na albufeira do Alqueva (adaptado <http://www.edia.pt/portal/> acedido a 7 Janeiro 2006).

Na Figura I.2 está representada uma das plataformas, distribuídas pela albufeira, onde se realizaram as recolhas das amostras durante a campanha.



**Figura I.2.** Plataforma de Alcarrache na albufeira de Alqueva.

O programa de avaliação decorreu no período de Janeiro de 2006 a Junho de 2007. A amostragem teve uma periodicidade bimestral, contabilizando no total 9 amostragens. Os meses de recolha das amostras foram Fevereiro (F06), Março (Mr06), Maio (M06), Julho (J06), Setembro (S06), Novembro (N06) de 2006 e Fevereiro (F07), Março (Mr07), Maio (M07) e Julho (J07) de 2007. O período húmido integrou os meses de Outubro a Março, e o período seco de Abril a Setembro. Cada amostra foi caracterizada em 26 variáveis que incluem parâmetros físico-químicos, microbiológicos metais totais e pesticidas.

### I.2.2. Metodologia de Campo

Em cada estação de amostragem foram recolhidos 2 L de água para a realização das análises físico-químicas e 1 L de água, em garrafas de cor âmbar para a análise dos pesticidas. Para a análise bacteriológica recolheu-se um volume de 1,5 L de água, em condições de assepsia e utilizando frascos esterilizados.

As amostras foram acondicionadas em malas térmicas com temperaturas entre 0 e 4°C até à chegada ao laboratório.

Em cada local de amostragem foram analisados vários parâmetros: percentagem de saturação do oxigénio dissolvido; temperatura; pH; potencial redox e condutividade. Estes parâmetros foram medidos com uma sonda multiparamétrica (WTW Multi 350i), com recurso a um eléctrodo de pH (WTW pH electrode Sentix 41 – 3) calibrado com duas soluções padrão a pH 7,01 e 4,01, a um eléctrodo combinado de condutividade e oxigénio dissolvido (WTW ConOx – 3), calibrado na cápsula para a percentagem de saturação (100%) e a um eléctrodo de platina imerso numa solução de cloreto de potássio (WTW Sentix - ORP), calibrado numa solução tampão padrão a 220 mV. A calibração das sondas foi sempre verificada antes da saída para o campo.

Na figura I.3 está representado o material utilizado garrafa de *Van Dorn* e sonda de campo, bem como as amostras de água recolhidas em cada estação de amostragem.



**Figura I.3.** Material utilizado e recolhido em cada campanha de amostragem, durante o estudo.

### I.2.3. Parâmetros Analíticos e Metodologias utilizadas

Após a chegada ao laboratório, procedeu-se à conservação das amostras de água, de acordo com a Tabela I.1.

**Tabela I.1.** Procedimento para a conservação das amostras de água

Parâmetro	Método de conservação
CBO <sub>5</sub>	Análise a efectuar no dia da recolha
Fósforo Total	
Nitritos	Refrigeração
Cloretos	
Azoto amoniacal e Kjeldahl	0,8 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> para 1L de amostra
Nitratos	Congelação
CQO	2 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> para 1 L de amostra
Oxidabilidade	5 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 7,5 M para 1 L de amostra
COT	Acidificação
Metais Totais	1 ml de ácido nítrico concentrado para 1L de amostra
Pesticidas	Refrigeração (análise a efectuar no máximo 1 ou 2 dias após a colheita)
Microbiológicos	Refrigeração, recolha em frascos esterilizados (análise a efectuar no dia da recolha)
Ecotoxicológicos	Congelação

CBO<sub>5</sub> – carência bioquímica de oxigénio; CQO – carência química de oxigénio; COT – carbono orgânico total.

A determinação dos parâmetros físico-químicos e relativos a substâncias indesejáveis e tóxicas seguiu os protocolos descritos em Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

Os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e relativos a substâncias indesejáveis e tóxicas, que foram realizados encontram-se legislados no Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto, que estabelece as normas, critérios e objectivos de qualidade no que respeita a águas superficiais destinadas ao consumo humano, à rega e a actividades balneares e que foi adaptado da Directiva Comunitária 75/440/CE (ECC, 1975).

Os parâmetros microbiológicos quantificados foram os coliformes totais, e a contagem de enterococos fecais, e foram realizados segundo as normas ISO 9308 – 2 de 1999 e ISO 7899-2 de 2000, respectivamente.

Os pesticidas integrados neste estudo foram quantificados segundo a norma DIN ISO 6468 (1996).

Na Tabela I.2 encontram-se representados os parâmetros analisados no estudo, as técnicas analíticas usadas para a sua quantificação e as unidades utilizadas, bem como os níveis máximos recomendados e admissíveis pela Legislação Portuguesa (Decreto-Lei nº 236/98), para uma água do tipo A1 (necessita de tratamento físico e desinfecção) para consumo humano.

**Tabela I.2.** Parâmetros analíticos, abreviaturas, unidades e técnicas analíticas utilizadas no estudo da qualidade da água da albufeira do Alqueva.

Parâmetro	Abreviatura	Unidades	Técnica Analítica	VMR	VMA
<b>pH</b>	pH	Sorensen scale	Potenciometria/ Sonda de pH	6,5-8,5	-
<b>Temperatura</b>	T	°C	Temperature	22	25
<b>Condutividade Eléctrica</b>	CE	$\mu\text{S cm}^{-1}$	Conductometria	1000	-
<b>Oxigénio Dissolvido</b>	OD	%	Potenciometria/ Sonda O <sub>2</sub>	70	-
<b>Potencial Redox</b>	Redox				-
<b>Carência Química Oxigénio</b>	CQO	$\text{mg L}^{-1}$	Técnica Dicromato	30	-
<b>Carência Bioquímica Oxigénio</b>	CBO <sub>5</sub>	$\text{mg L}^{-1}$	Respirométrico	3	-
<b>Nitritos</b>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	$\text{mg L}^{-1}$	EAM		
<b>Nitratos</b>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	$\text{mg L}^{-1}$	EAM	25	50
<b>Azoto Kjeldahl</b>	NK	$\text{mg L}^{-1}$	EAM	1	-
<b>Azoto Amoniacal</b>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	$\text{mg L}^{-1}$	EAM	0,05	
<b>Fósforo Total</b>	Pt	$\text{mg L}^{-1}$	EAM	0,20	-
<b>Cloretos</b>	Cl <sup>-</sup>	$\text{mg L}^{-1}$	EAM	200	-
<b>Oxidabilidade</b>	Oxid	$\text{mg L}^{-1}$	Titrimétrico	-	-
<b>Carbono Orgânico Total</b>	COT	$\text{mg L}^{-1}$	Oxidação UV do persulfato	-	-
<b>Coliformes Totais</b>	T. Coli	mpn 100 mL <sup>-1</sup>	Técnica de Tubos Múltiplos	50	
<b>Enterococcus Fecais</b>	Ent. F	ufu 100 mL <sup>-1</sup>	Filtração Membrana	20	
<b>Atrazina</b>	Atr	$\mu\text{g L}^{-1}$	CG	-	a)
<b>Simazina</b>	Smz	$\mu\text{g L}^{-1}$	CG	-	a)
<b>Terbutilazina</b>	Tba	$\mu\text{g L}^{-1}$	CG	-	a)
<b>Metolacloro</b>	Met	$\mu\text{g L}^{-1}$	CG	-	a)
<b>Clorpirifos</b>	Cpf	$\mu\text{g L}^{-1}$	CG	-	a)
<b>Endossulfão sulfato</b>	End	$\mu\text{g L}^{-1}$	CG	-	a)
<b>Ferro</b>	Fe	$\text{mg L}^{-1}$	FCE	0,10	0,30
<b>Manganês</b>	Mn	$\text{mg L}^{-1}$	FCE	0,05	-
<b>Arsénio</b>	As	$\text{mg L}^{-1}$	EAA	0,01	0,05

(\*) VMR – valor máximo recomendado; VMA – valor máximo admissível, pela legislação Portuguesa (Decreto-Lei nº236/98); UV – ultra-violeta; EAM – Espectrometria de Absorção Molecular; CG – Cromatografia Gasosa (DIN ISO 6468); FCE – Fotometria de Chama de Emissão; EAA – Espectrometria de Absorção Atómica. (a) Nas águas superficiais o máximo de concentração de pesticidas totais admissível é 1,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### I.2.4. Análise Estatística

A representação gráfica dos valores (média±desvio padrão) de cada parâmetro durante o estudo para a detecção de padrões de variabilidade foi efectuada a partir do programa estatístico STATISTICA 6.0 (2001).

Com o objectivo de analisar gradientes temporais e espaciais para os vários parâmetros, efectuou-se a representação gráfica de descritores estatísticos, através do método *Box-and-Whisher*. Este método permite detectar a presença de *outliers* e notar comportamentos assimétricos no vector de dados, pois o gráfico divide a informação em quatro áreas com frequências iguais. A caixa central engloba 50% dos valores totais situados entre os valores médios±desvio padrão.

Utilizou-se a análise de correlação de *Spearman R* para avaliar correlações entre variáveis não paramétricas, o que possibilitou a integração de todas as variáveis, mesmo as que não apresentaram uma distribuição normal (Wunderline *et al.*, 2001).

No sentido de eliminar a influência de diferentes escalas e magnitudes das variáveis e possibilitar realçar as variáveis mais importantes na variabilidade da qualidade da água da albufeira, aplicaram-se técnicas de análise multivariada, nomeadamente a ACP e a ACL. Antes da aplicação destas técnicas estatísticas os dados originais tiveram que ser sujeitos a um pré-tratamento de padronização e escalonamento através de uma transformação à escala *z* (Neto e Moita, 1998; Liu *et al.*, 2003; Simeonov *et al.*, 2005). A padronização possibilita minimizar a influência das diferentes variâncias de cada variável e eliminar a influência das várias unidades de medida (Singh *et al.*, 2005).

A ACL é uma técnica de agrupamento hierárquico que interliga as amostras similares agrupando-as em classes (*clusters*). Assim, é produzido um dendrograma, onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si (Vega *et al.*, 1998; Wunderline *et al.*, 2001). O dendrograma foi construído usando a distância *Eucladiana* e o método de Ward (Otto, 1998; Güler e Thyne, 2004).

A distância de ligação é calculada a partir da expressão  $D_{link}/D_{max}$  que representa a razão entre a distância para um caso particular e a máxima distância de ligação. A suposição básica da sua interpretação é que, quanto menor a distância entre os pontos, maior é a semelhança entre as amostras. Assim, os objectos dentro da mesma classe apresentam similaridade entre si e diferenças com os objectos que integram as outras classes (Adams, 1998).

A ACP consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras num outro sistema de eixos mais conveniente para a análise dos dados. Assim, as  $n$ -variáveis originais geram, através de combinações lineares,  $n$ -componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém maior informação estatística que a componente principal 2 (Meglen, 1992). Este método permite a redução da dimensionalidade da matriz de dados pois, embora a informação estatística presente nas  $n$ -variáveis originais seja a mesma dos  $n$ -componentes principais, é comum obter em apenas quatro ou cinco das primeiras componentes mais de 90% desta informação (Otto, 1998; Neto e Moita, 1998; Wunderlin *et al.*, 2001). Por outro lado, a matriz de correlações permite agrupar os parâmetros que se encontram mais fortemente associados.

A ACP também pode ser usada para avaliar a importância das variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior peso (*loadings*) na combinação linear dos primeiros componentes são as mais importantes do ponto de vista estatístico. Neste estudo, os factores *loadings* das variáveis originais são agrupados segundo a classificação proposta por Liu *et al.* (2003): forte ( $> 0,75$ ); moderada (0,75-0,50) e fraca (0,50-0,30). Cada parâmetro, na nova matriz de componentes principais, tem um valor próprio que indica a importância que esse parâmetro apresenta para a explicação de cada uma das componentes principais da matriz. Assim, para a interpretação dos resultados utilizou-se o critério de Kaiser (Kaiser, 1960) que indica que só os componentes principais que apresentarem correlações (atributos) superiores ou iguais a 1 serão aceites como fonte de variância da matriz de dados.

Os componentes principais que apresentaram valor próprio superior a 1 são sujeitos a análise *varimax*, que reduz a contribuição das variáveis menos significativas obtidas pela ACP (Helena *et al.*, 2000; Hildebrandt *et al.*, 2008). Assim, um menor número de factores é tido em consideração para aproximadamente a mesma quantidade de informação de dados originais. Esta análise permite desta forma, a simplificação da estrutura dos resultados, o que é muito importante em estudos com um grande número de dados.

Os parâmetros analíticos foram determinados em triplicado e, os valores médios foram utilizados para a subsequente análise de dados.

### **I.3. Resultados e Discussão**

Os dados recolhidos durante o estudo permitiram organizar uma matriz de dados, analisada no sentido de compreender a dinâmica do sistema e detectar diferenças entre períodos e locais amostrados. A análise gráfica dos valores (média±desvio padrão) permitiu inferir sobre os parâmetros que mais influenciam a dinâmica (espacial e temporal) da massa da água da albufeira, durante o estudo. Os parâmetros foram divididos segundo as propriedades que permitem avaliar as diferentes características da massa de água. A aplicação de técnicas de análise multivariada permitiu determinar similaridades entre locais e caracterizar quais os parâmetros que mais influenciam cada um dos períodos temporais.

#### **I.3.1. Parâmetros de Estratificação: Temperatura, pH e Oxigénio Dissolvido**

Na tabela I.3 encontram-se os valores dos parâmetros de estratificação, determinados nos locais de amostragem, por medição com sonda de campo.

No que respeita à temperatura os valores obtidos no período de estudo estão de acordo com os limites impostos pela legislação em vigor.

O pH da água apresentou valores superiores no período seco. Este facto pode ser explicado pelo aumento do consumo de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) pela fotossíntese, com a conseqüente diminuição dos iões hidrogénio ( $\text{H}^+$ ) provenientes da dissociação de ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). O aumento de consumo de  $\text{CO}_2$  é justificado pelo aumento do fitoplâncton. O aumento de fitoplâncton no período seco, na albufeira, foi descrito por Galvão *et al.* (2008). Na estação de Sra. Ajuda o perfil de pH inverteu-se sendo os valores médios de pH mais altos no período húmido. Este facto pode ser explicado pelo excessivo aporte de matéria orgânica de fora da bacia, no período húmido, o que pode promover a degradação heterotrófica com o conseqüente aumento de  $\text{CO}_2$  e possível produção de  $\text{H}_2\text{CO}_3$ .

Na estação de Ardila o valor de pH foi similar nos dois períodos em análise. Este resultado suporta a hipótese que nos locais onde ocorre maior entrada de matéria orgânica fora da bacia, a diferença entre os valores médios de pH nos dois períodos em análise não é tão acentuada.

No que respeita à percentagem de saturação de oxigénio dissolvido, os valores mais baixos à superfície da água podem ser interpretados quer pelo aumento da temperatura da água nos meses quentes, com a consequente diminuição da solubilidade do gás, quer por processos de degradação de matéria orgânica. Os valores mais baixos de oxigénio dissolvido foram observados em Julho de 2006, na estação de Sra. Ajuda.

**Tabela I.3.** Valores médios (média±desvio padrão, n=3) e limites (mínimo - máximo) dos parâmetros de estratificação: pH, temperatura e oxigénio dissolvido, durante o período de estudo.

	pH	Temperatura (°C)	Oxigénio Dissolvido (%)
Álamos	7,9±0,5 (7,1-8,8)	18±6 (10-28)	82 ±11 (65-97)
Alcarrache	8,0±0,5 (6,9-8,9)	19±6 (11-28)	98±25 (78-157)
Mourão	8,1±0,6 (7,2-9,4)	18±7 (10-28)	95±29 (75-167)
Montante	8,1±0,3 (7,7-8,8)	18±6 (10-27)	87±11 (72-106)
Juzante	8,0±0,5 (7,2-8,8)	18±7 (10-28)	89±26 (63-131)
Lucefêcit	8,1±0,7 (6,7-9,4)	18±6 (10-27)	101±41 (65-113)
Moinho	7,6±0,7 (6,7-8,6)	18±7 (10-28)	92±21 (70-127)
Barcas	7,7±0,9 (6,6-9,3)	18±7 (9-28)	77±27 (39-112)
Sra. Ajuda	8,2±0,5 (7,4-8,9)	19±7 (10-29)	102±32 (55-158)

## I.3.2. Parâmetros de Mineralização

### I.3.2.1. Condutividade Eléctrica

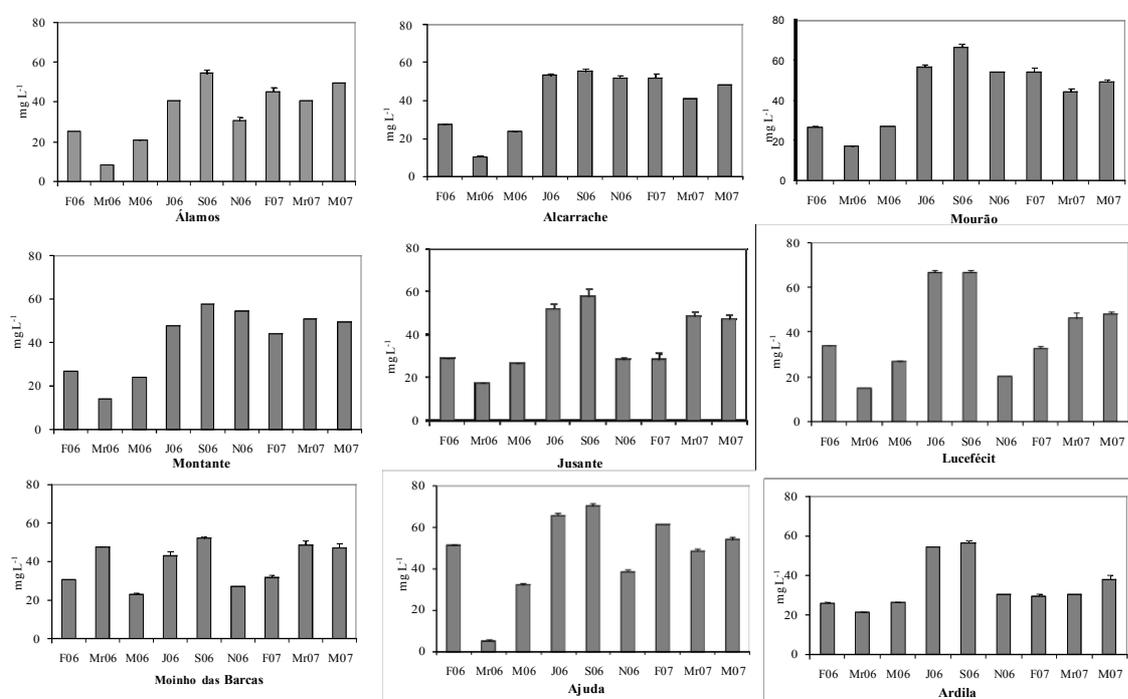
Os valores médios de condutividade foram superiores no período seco, o que está de acordo com o descrito por Wetzerl (2001), que indica que a condutividade aumenta cerca de 2% por cada grau Celcius (°C). A estação de amostragem que apresentou valores de condutividade mais elevados foi Ardila (Tabela I.4), no entanto sempre abaixo do valor máximo recomendado (VMR).

**Tabela I.4.** Valores médios (média±desvio padrão, n=3) e limites (mínimo - máximo) do parâmetro condutividade eléctrica, durante o período de estudo.

	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
Álamos	453±51 (354-518)
Alcarrache	488±29 (419-518)
Mourão	501±18 (470-525)
Montante	494±13 (480-522)
Juzante	456±74 (315-530)
Lucefécit	472±87 (286-547)
Moinho Barcas	467±89 (321-598)
Sra. Ajuda	542±96 (368-676)
Ardila	437±75 (342-523)

### I.3.2.2. Cloretos

Pela análise da Figura I.4 observa-se que, todas as estações apresentaram valores dentro do VMR para uma água doce superficial para produção de água para consumo humano. Sra. Ajuda, nos meses de Julho e Setembro de 2006, foi a estação que apresentou valores mais elevados de cloretos. Este facto pode ser justificado quer pelo aumento de descargas pontuais de efluentes domésticos a montante da albufeira quer por um aumento dos níveis de evaporação neste período. Valores mais acentuados de cloretos, no período húmido, podem ser explicados por processos de precipitação.

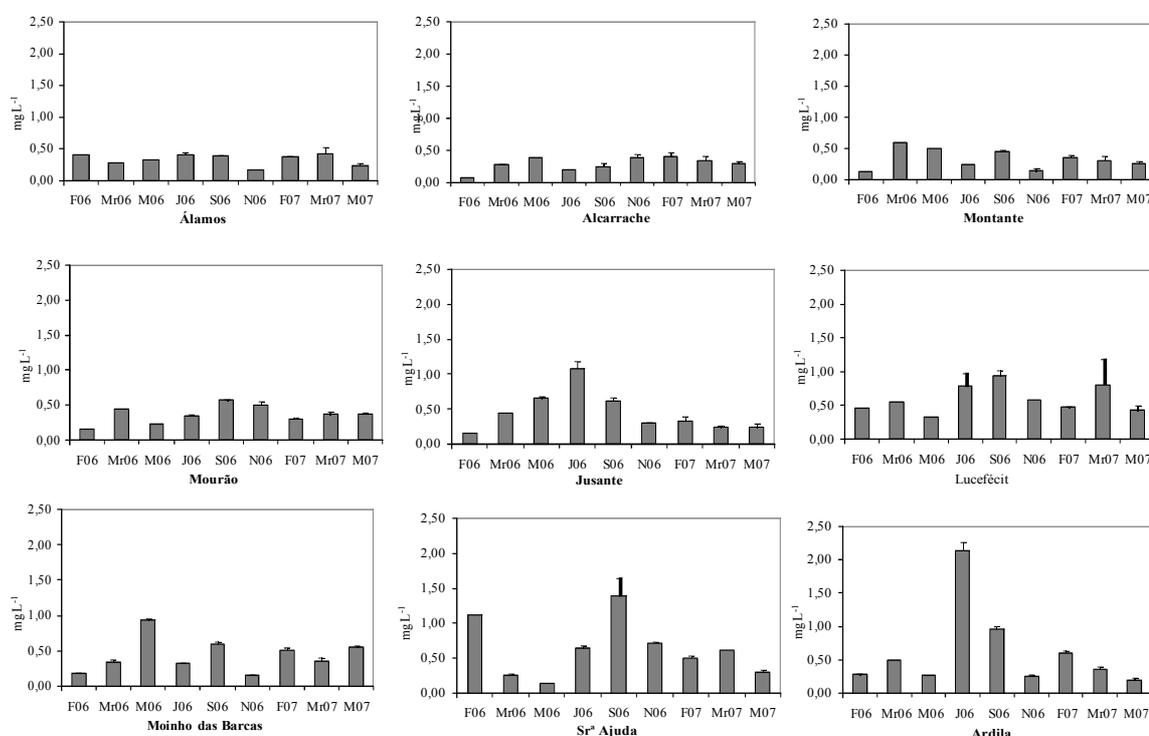


**Figura I.4.** Variação do parâmetro cloretos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão;  $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.

### I.3.3. Nutrientes

#### I.3.3.1 Azoto Kjeldahl

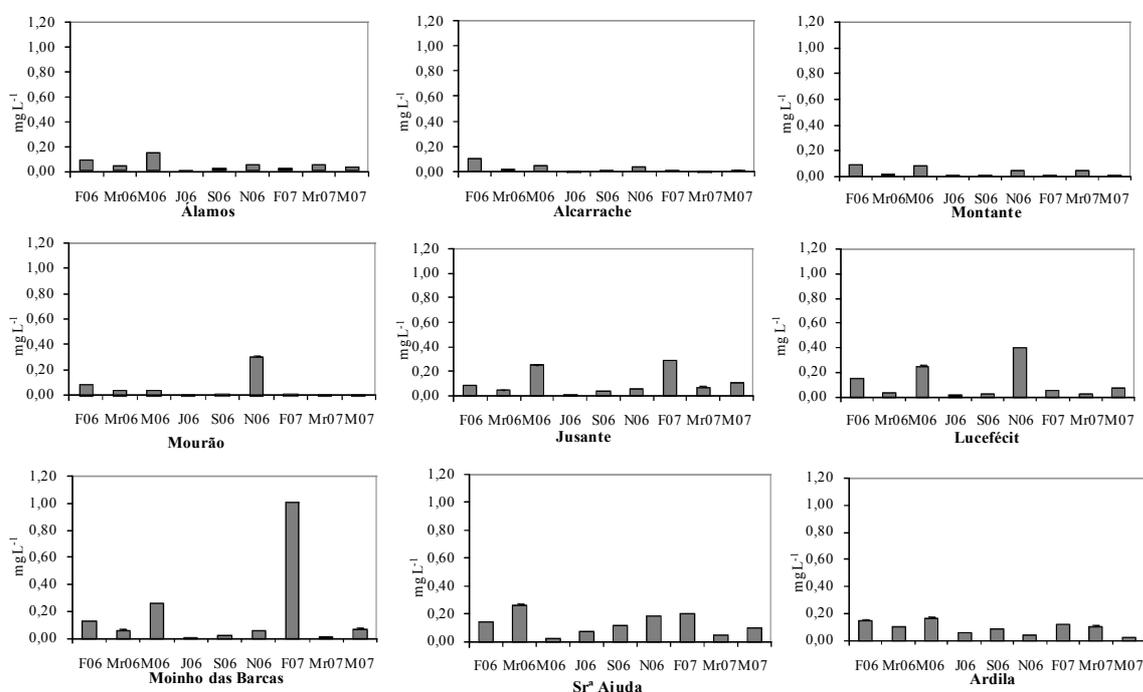
O azoto kjeldahl (Fig. I.5) apresentou concentrações mais elevadas nos locais de Ardila e Sra. Ajuda, o que pode ser explicado pelo possível aumento das descargas pontuais a montante da albufeira. As descargas pontuais, no Ardila, provêm de efluentes industriais não tratados, de indústrias transformadoras (queijarias, vinho e carnes) e de lagares de azeite (PROCESL, 2003). No caso de Sra. Ajuda, as fontes de poluição pontual em território Português, integram unidades de tratamento de curtumes e peles, lagares de azeite e unidades pecuárias (predominantemente, suiniculturas) sem tratamento dos seus efluentes. Por outro lado, Sra. Ajuda sofre ainda a influência de descargas pontuais provenientes do território espanhol. Pela análise dos resultados obtidos para os vários componentes do ciclo do azoto, podemos concluir que a maioria do azoto se encontra na forma de azoto orgânico, proveniente dos processos de fertilização, uma vez que as quantidades de azoto amoniacal assumem pouca expressividade salvo algumas exceções.



**Figura I.5.** Variação do parâmetro azoto kjeldahl ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão;  $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.

### I.3.3.2. Azoto Amoniacal

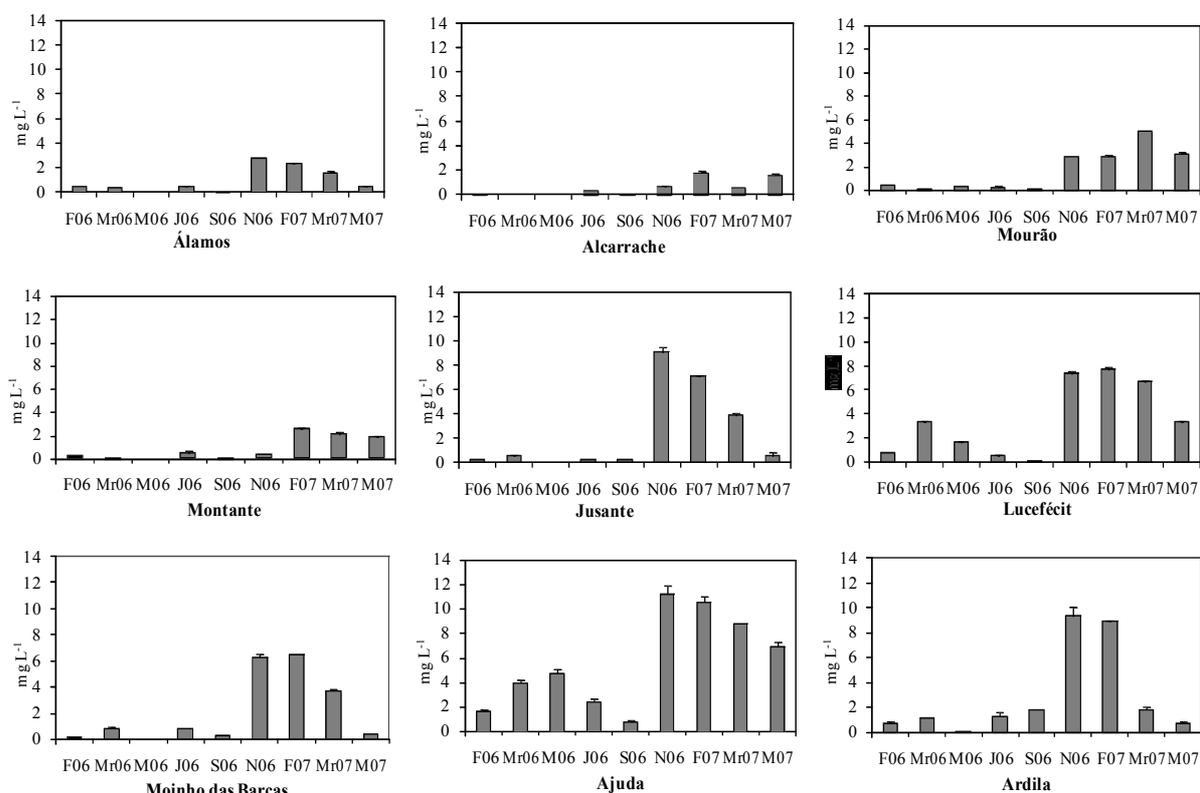
Os valores de azoto amoniacal (Fig. I.6), durante o estudo, encontraram-se sempre abaixo do VMA pela legislação. As estações de amostragem mais influenciadas, por este parâmetro, foram Moinho das Barcas, Sra. da Ajuda e Ardila. O aumento do azoto amoniacal pode estar relacionado com o elevado aporte de carga orgânica e de fertilizantes, devido a processos de lixiviação, a estes locais da albufeira, com o consequente aumento dos processos de desnitrificação.



**Figura I.6.** Variação do parâmetro azoto amoniacal ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão;  $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.

### I.3.3.3. Nitratos

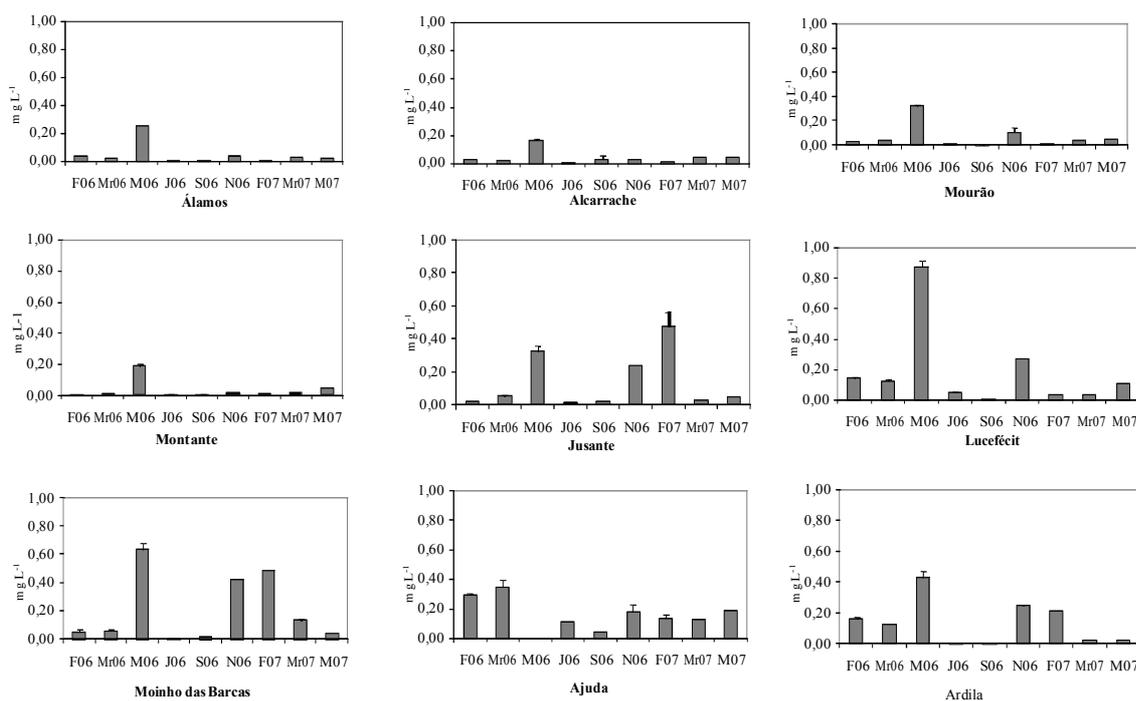
Relativamente ao parâmetro nitratos observa-se (Fig. I.7) que os valores obtidos durante o período de amostragem estão abaixo do VMR. Os locais mais influenciados por este parâmetro foram Sra. Ajuda, Ardila e Lucefecit, provavelmente pela intensa utilização de fertilizantes agrícolas nas áreas envolventes. Nos meses mais quentes a concentração de nitratos diminuiu nas águas à superfície devido ao seu consumo, para a degradação da matéria orgânica. Assim, com a diminuição da quantidade de oxigénio dissolvido, os microorganismos começam a utilizar os nitratos como aceitador final de electrões no processo da respiração (Manahan, 2000). Durante o período húmido registou-se um aumento da concentração deste parâmetro, que poderá ser explicado pelos processos de lixiviação dos terrenos agrícolas, cumulativamente com o aumento do processo de nitrificação e com a redução da sua assimilação.



**Figura I.7.** Variação do parâmetro nitratos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão;  $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.

### I.3.3.4. Nitritos

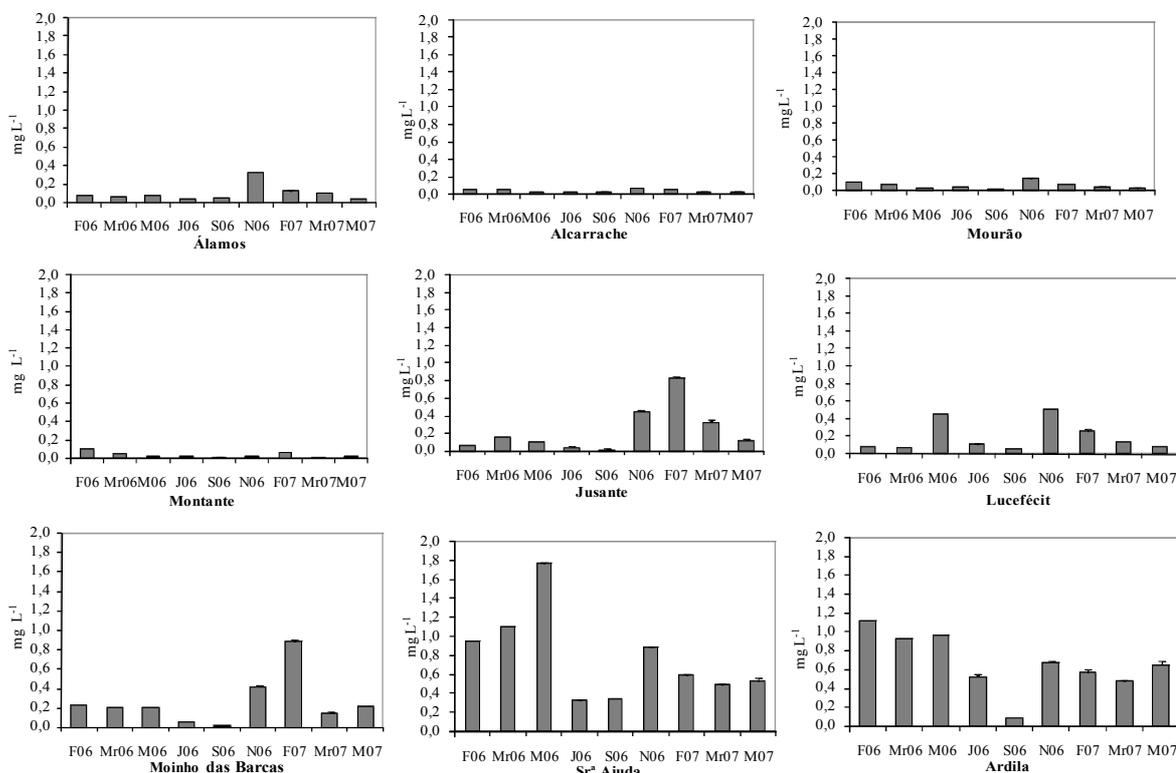
Os nitritos registaram as concentrações mais elevadas no mês de Maio 2006 (Fig. I.8). As concentrações de nitrito voltaram a aumentar em Novembro e Fevereiro. Este aumento esteve associado provavelmente a um aumento de poluição pontual de origem orgânica e que está coerente com a elevada contaminação microbiana no local.



**Figura I.8.** Variação do parâmetro nitritos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão;  $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.

### I.3.3.5. Fósforo

Os locais de amostragem Montante, Mourão e Alcarrache apresentaram valores de fósforo total sempre abaixo do VMR (Fig. I.9). Os valores de fósforo total nos locais de Ardila e Sra. Ajuda, afluentes à albufeira, foram os mais elevados, durante o estudo. Este resultado vem suportar resultados anteriores (PROCESL, 2003), permitindo caracterizar estes afluentes à albufeira por uma degradação geral da qualidade da água, com elevada produtividade, e o conseqüente aumento de algas e de processos de eutrofização. A análise sazonal mostra que o período em que este parâmetro se encontrou em maior quantidade foi o período húmido, provavelmente devido ao aumento de escorrências, e de precipitação. As concentrações de fósforo no período seco foram em geral baixas, o que não implica reduzida importância, mas sim a indicação do elevado consumo deste nutriente pelo fitoplancton e pelas bactérias decompositoras.

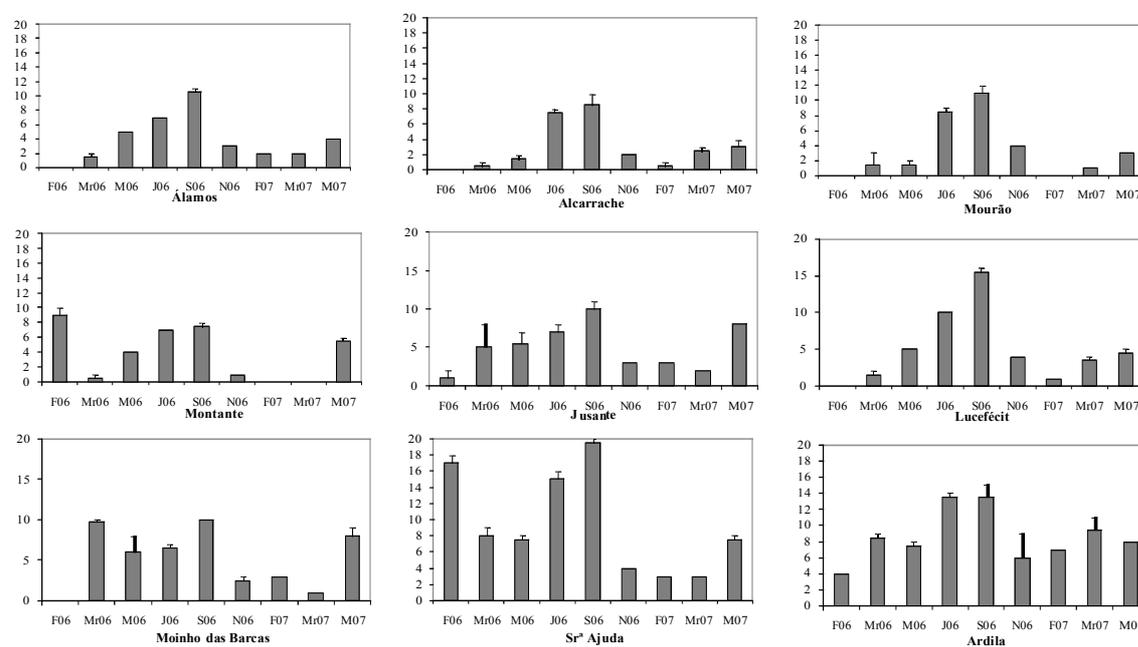


**Figura I.9.** Variação do parâmetro fósforo total ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão;  $n=3$ ), em cada estação de amostragem, no período de estudo.

### I.3.4. Descritores Orgânicos

#### I.3.4.1 Carência Bioquímica de Oxigênio

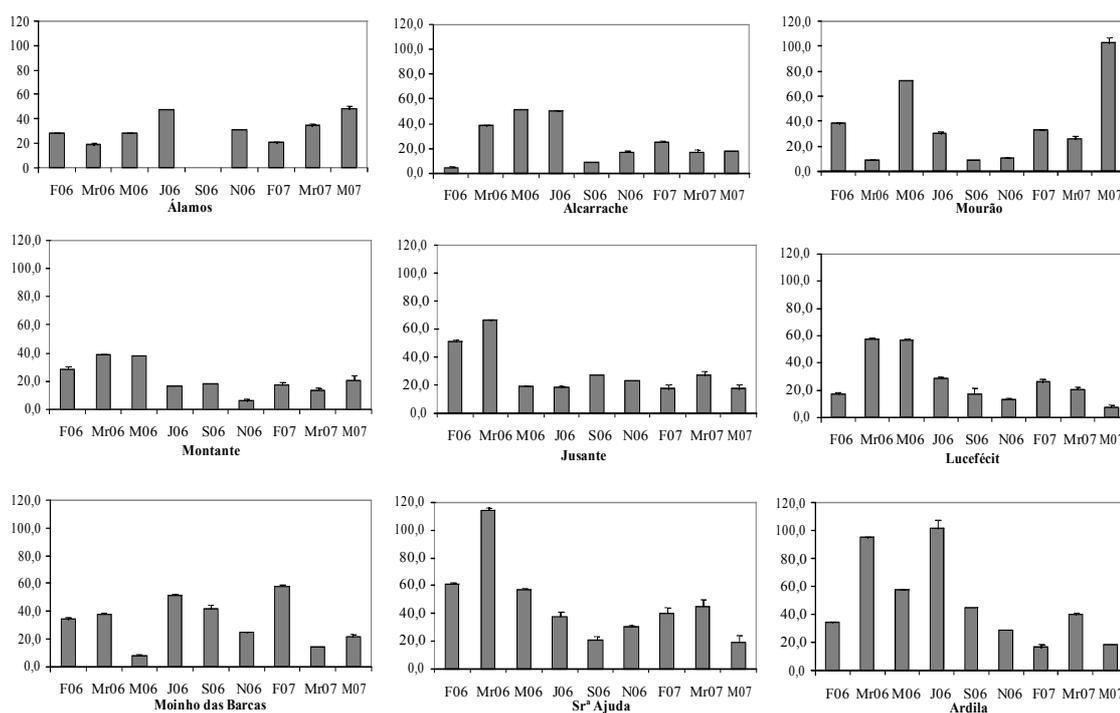
Quanto ao parâmetro  $CBO_5$  (Fig I.10), que representa a matéria orgânica bioquimicamente degradável, este atingiu concentrações mais elevadas no período seco. A nível espacial observamos a ocorrência de concentrações mais elevadas nos locais Lucefecit, Moinho das Barcas, Sra. Ajuda e Ardila. Este parâmetro ultrapassou o VMA, em todos os locais, nos meses de Julho e Setembro.



**Figura I.10.** Variação do parâmetro  $CBO_5$  (mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) (média desvio padrão; n=3), em cada estação de amostragem, no período de estudo.

### I.3.4.2. Carência Química de Oxigénio

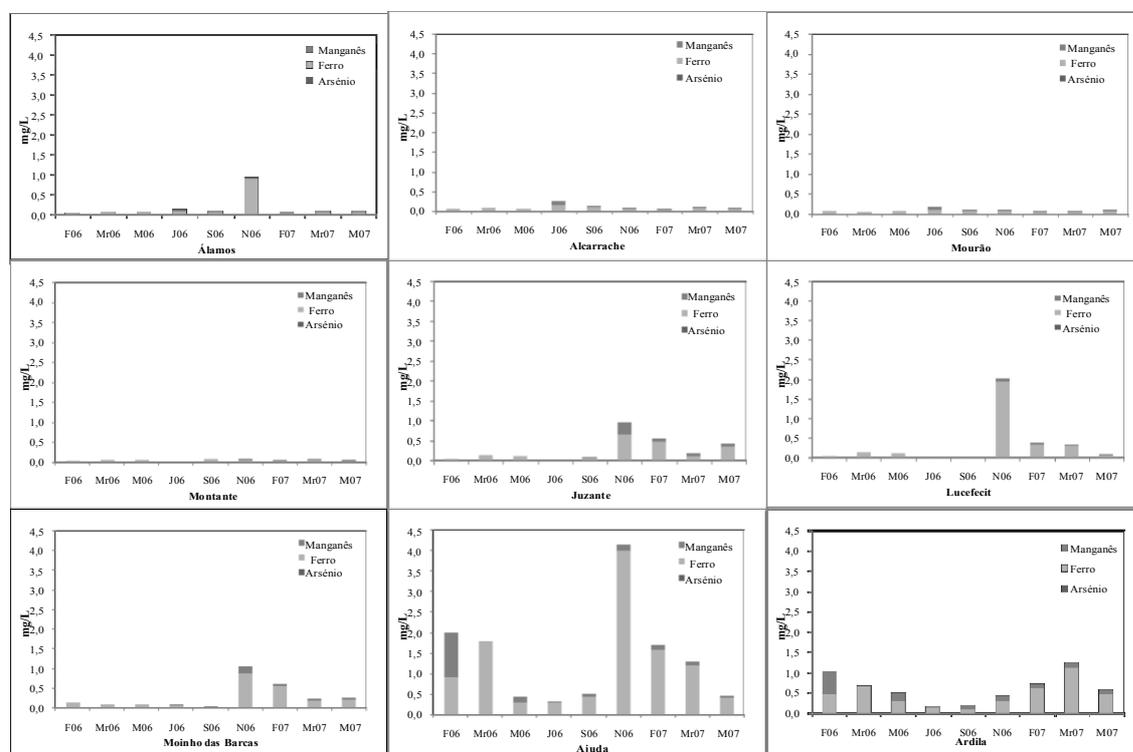
Relativamente ao parâmetro CQO (Fig. I.11), que representa a matéria orgânica degradável quimicamente, verificou-se que os locais que apresentaram valores superiores foram Moinho das Barcas, Sr<sup>a</sup>Ajuda, e Ardila. Durante o período seco ocorreu uma ligeira diminuição deste parâmetro, em praticamente todos os locais de amostragem. As principais fontes de poluição antropogénica são os efluentes industriais. É de salientar a importância de algumas fontes tóxicas de poluição industrial, correspondentes a actividades de carácter sazonal, como os lagares de azeite, com efluentes no período de Dezembro/Janeiro de pH muito reduzido e com elevados teores em matéria orgânica, óleos e fenóis e as adegas com efluentes em Setembro, com elevada concentração de matéria orgânica e detergentes.



**Figura I.11.** Variação do parâmetro CQO (mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) (média desvio padrão; n=3), em cada estação de amostragem, no período de estudo.

### I.3.5. Metais Totais

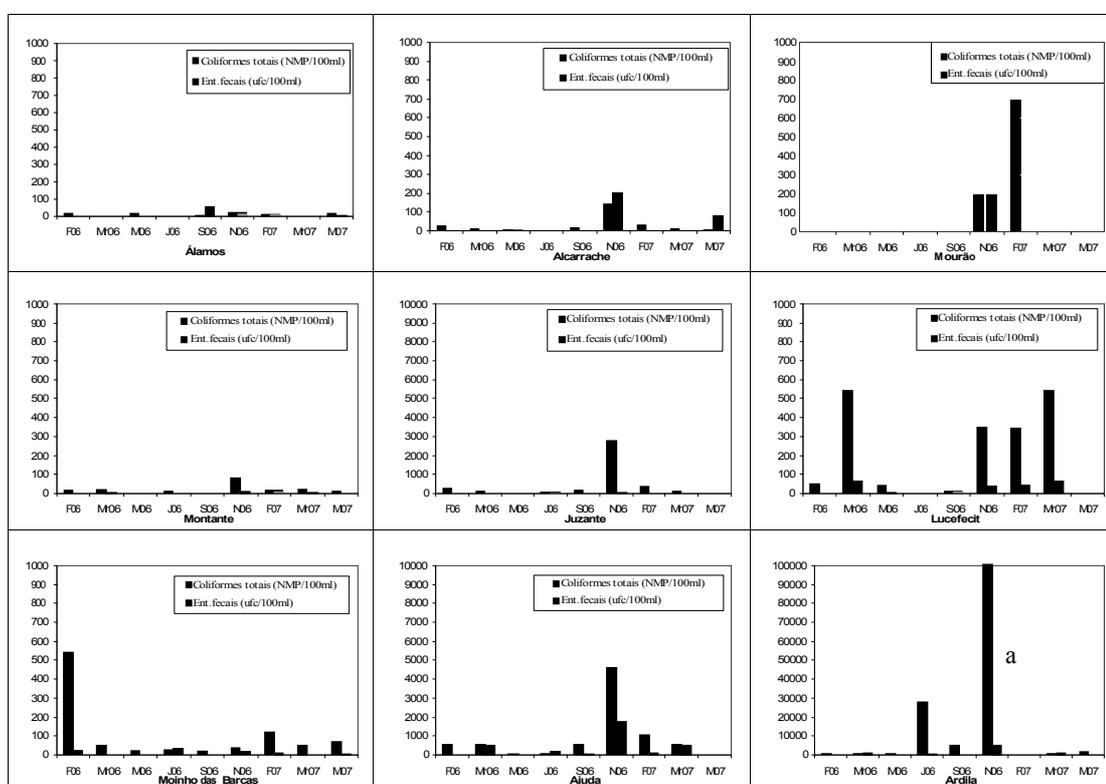
Na Figura I.12 estão representados graficamente os valores dos metais totais Fe, Mn e As. As concentrações mais elevadas dos metais avaliados ocorrem no período húmido, justificado pelo aumento das condições redutoras e consequente redução dos metais a formas solúveis. O Fe ultrapassou os valores limites legislados em Sra. Ajuda, no período húmido, este facto pode ser explicado por contaminação pontual proveniente da Mina de Azeiteiros (Campo Maior) (Santos Oliveira, 2002; Matos e Almeida, 2006). O Mn ultrapassou o máximo admissível nos locais de amostragem de Jusante, Sra. Ajuda e Ardila. A contaminação destes locais pode estar relacionada com a poluição originada das minas de Vila Ruiva e Preguiça (Moura), Bugalho (Alandroal), Algarés (Portel) (Santos Oliveira, 2002; Matos e Almeida, 2006). O As é um subproduto da actividade mineira e está referenciado como substância prioritária, que não respeita o objectivo de qualidade ambiental na Bacia do Guadiana (IA, 2005). No entanto, este parâmetro não ultrapassou o VMA em nenhuma estação de amostragem.



**Figura I.12.** Variação dos metais totais (As, Fe e Mn) ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (média desvio padrão;  $n=3$ ), no período de estudo.

### I.3.6. Parâmetros Microbiológicos

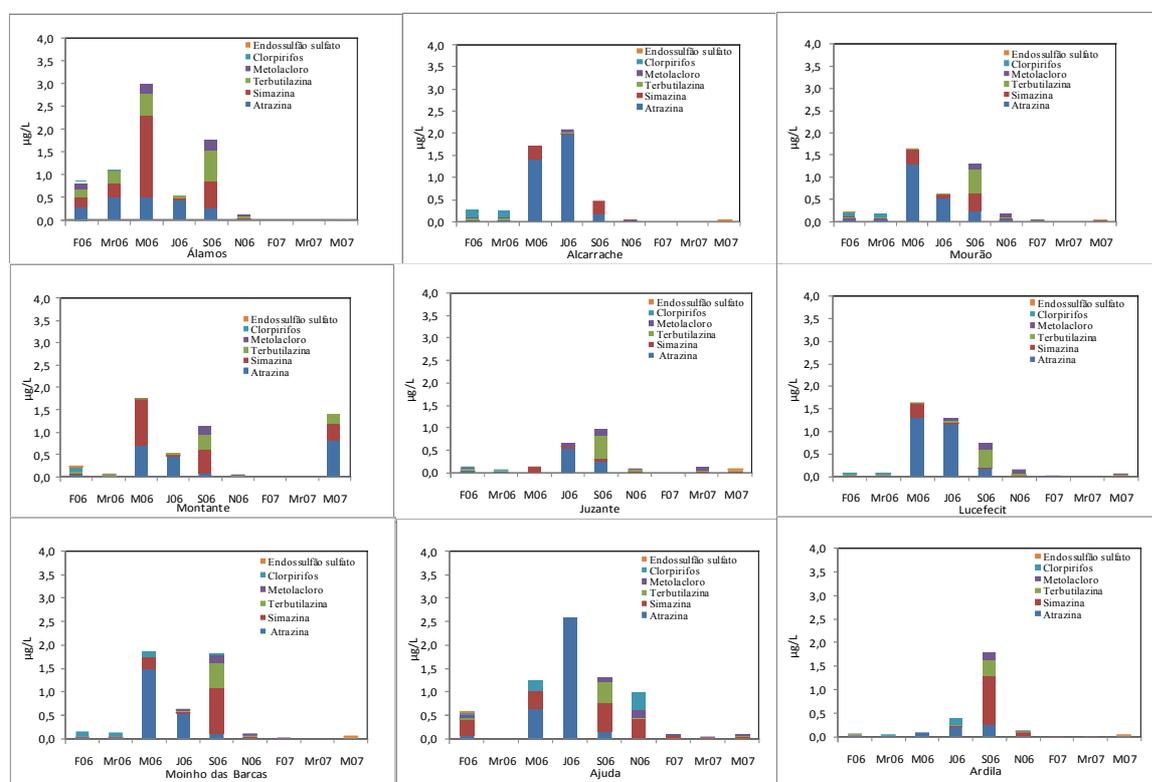
No que respeita à qualidade microbiológica da água, na Figura I.13 estão representados os valores de coliformes totais e enterococos fecais, durante o período em estudo. A análise da variabilidade espacial permitiu concluir que a contaminação microbiológica é mais elevada nos locais de Sra. Ajuda e Ardila, locais afluentes à albufeira. Os valores elevados destes parâmetros no período húmido podem ser justificados por processos de lixiviação. A contaminação microbiológica é um dos principais factores que pode pôr inviabilizar a utilização da água da albufeira para rega e para a prática balnear.



**Figura I.13.** Variação dos parâmetros coliformes totais (NMP/mL) e enterococos fecais (ufc/100mL), em cada estação de amostragem, no período de estudo. a) Representa valores de coliformes totais superiores a 100 000 NPM/100mL.

### I.3.7 Pesticidas

Na Figura I.14 encontram-se representados os valores médios quantificados de pesticidas na albufeira durante o período de estudo. Pela análise da figura, os herbicidas foram a classe de pesticidas detectada em maior quantidade na albufeira. Em termos temporais no período seco observou-se concentrações mais elevadas destes poluentes do que no período húmido. No que diz respeito à variação espacial, verificou-se que a maior concentração de pesticidas totais ocorreu nos locais de Álamos, Sr. Ajuda e Montante.



**Figura I.14.** Variação dos pesticidas (atrazina, simazina, terbutilazina, metolaclo, clorpirifos e endossulfão sulfato) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (média desvio padrão;  $n=3$ ), no período de estudo.

### I.3.7. Análise Multivariada

#### I.3.7.1. Correlações de *Pearson* e de *Spearman*

A ACP é baseada na diagonalização da matriz de correlações. A observação desta matriz de correlações é importante pois pode estabelecer à partida associações entre variáveis e mostrar a coerência global da análise. Esta matriz de correlações deve ser interpretada com algum cuidado pois é afectada simultaneamente por variações temporais e espaciais. A Tabela I.5. mostra as correlações de *Pearson* ( $r$ ) entre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos, metais totais e pesticidas. As correlações de *Pearson* estão compreendidas entre 0,22 e 0,92 para um grau de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). Devido ao elevado número de graus de liberdade (25), o coeficiente de *Pearson* é muito baixo 0,22 o que indica que o número de correlações significativas é muito elevado. Este facto torna o teste muito questionável uma vez que uma correlação significativa indica simplesmente que o  $r$  é diferente de zero. Estas situações são frequentes quando se está a analisar uma série de parâmetros, ao longo do tempo em vários locais. No entanto, se estreitarmos o intervalo de confiança para  $p < 0,0001$  verificamos que alguns dos parâmetros analisados estão fortemente correlacionados. Assim, pela análise da tabela, podemos verificar uma correlação fortemente positiva entre o pH e o oxigénio dissolvido. Por outro lado, o pH está correlacionado negativamente com o ferro, pois o aumento de pH faz diminuir os iões metálicos, ou seja as formas biodisponíveis na água. Os parâmetros de mineralização condutividade eléctrica e cloretos apresentam uma correlação positiva ( $r=0,415$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n=81$ ). O fósforo total apresenta uma correlação positiva com os nitratos ( $r=0,498$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n=81$ ), os nitritos ( $r=0,407$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n=81$ ) e a oxidabilidade ( $r=0,689$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n=81$ ). Muitos destes compostos podem provir de processos degradativos de materiais residuais de origem animal, daí a sua correlação com a matéria orgânica.

Outro método de correlação utilizado foi a correlação de *Spearman*, com o objectivo de integrar as variáveis com uma distribuição não-normal. O coeficiente de *Spearman* é um método não-paramétrico que estabelece correlações entre variáveis agrupadas. Este método foi utilizado para analisar a variabilidade temporal dos vários parâmetros, ou seja, correlacionar cada um dos parâmetros quantificados com cada período (seco/húmido). Assim a temperatura da água exibe o coeficiente de correlação positivo e o mais elevado com o período (*Spearman-R*=0,853;  $p<0,0001$ ). Em adição à temperatura, existem mais 12 parâmetros que apresentam significativas correlações com o período: pH (*Spearman-R*=0,394;  $p<0,00027$ ); condutividade eléctrica (*Spearman-R*=0,423;  $p<0,00008$ );  $\text{CBO}_5$  (*Spearman-R*=0,595;  $p<0,0001$ ); fósforo total (*Spearman-R*=-0,345;  $p<0,0016$ ); nitratos (*Spearman-R*=-0,418;  $p<0,00010$ ); cloretos (*Spearman-R*=0,376;  $p<0,00054$ ); coliformes totais (*Spearman-R*=-0,394;  $p<0,00027$ ); enterococos fecais (*Spearman-R*=-0,26973;  $p<0,014886$ ); atrazina (*Spearman-R*=0,488;  $p<0,0001$ ); simazina (*Spearman-R*=0,532;  $p<0,00001$ ); terbutilazina (*Spearman-R*=0,255;  $p<0,0214$ ); clorpirifos (*Spearman-R*=-0,333;  $p<0,0024$ ). Assim sendo, estes parâmetros foram os responsáveis pelas alterações da qualidade da água ao longo do período. A correlação positiva da temperatura com o pH pode ser explicada pelo aumento do consumo de  $\text{CO}_2$ , nos processos fotossintéticos. A correlação positiva com os cloretos pode ser explicada pelo aumento da evaporação no período seco, com o consequente aumento da concentração dos iões. A correlação negativa com os nitratos e o fósforo total pode ser explicada pelo aumento das taxas de assimilação destes nutrientes pelo fitoplâncton. As correlações positivas com os herbicidas e negativa com o clorpirifos podem ser explicadas pela época de aplicação destes nas culturas, pois os tempos de semi-vida destes compostos são pequenos.

**Tabela I.5.** Coeficientes de Correlações de *Pearson* (r) entre os 26 parâmetros do estudo (n=81).

	pH	T	OD	Redox	CE	CBO <sub>5</sub>	CQO	Pt	KN	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	Cl <sup>-</sup>	Oxid	COT	T. Coli	Ent. F	Atr	Smz	Tba	Met	Cpf	End	Fe	Mn	
<b>T</b>	0,26*																									
<b>OD</b>	0,5***	0,29*																								
<b>Redox</b>	-0,27*	-0,26*	-0,07																							
<b>CE</b>	0,42**	0,27*	0,03	-0,23*																						
<b>CBO<sub>5</sub></b>	0,37**	0,6***	0,22	-0,23*	0,36*																					
<b>CQO</b>	0,05	-0,07	-0,17	-0,05	0,12	0,14																				
<b>Pt</b>	-0,29*	-0,19	-0,19	0,12	-0,18*	0,2	0,37**																			
<b>KN</b>	0,16	0,3*	0,15	-0,28*	0,26*	0,55***	0,17	0,05																		
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N</b>	-0,17	-0,15	-0,08	0,02	-0,29*	-0,01	0,14	0,38**	0,1																	
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N</b>	-0,51***	-0,24*	-0,1	0,23*	-0,45***	-0,18	0	0,5***	0,02	0,26																
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N</b>	-0,04	-0,05	0,05	0,03	-0,24*	-0,03	0,18	0,46***	0	0,54***	0,32*															
<b>Cl<sup>-</sup></b>	0,13	0,54***	0,22*	-0,02	0,42**	0,47***	-0,25*	-0,22*	0,32*	-0,23*	-0,05	-0,39**														
<b>Oxid</b>	-0,26	-0,06	-0,09	0,07	-0,25*	0,28*	0,42***	0,69***	0,28*	0,3*	0,5***	0,25*	-0,05													
<b>COT</b>	-0,07	0,08	0,04	0,14	-0,12	0,2	0,01	0,21	0,31*	0,37**	0,21	0,16	0,06	0,35*												
<b>T. Coli</b>	0,02	0	0,28*	0	-0,2	0,03	0	0,14	-0,04	-0,03	0,28*	0,09	-0,06	0,01	0,01											
<b>Ent. F</b>	-0,06	-0,07	0,29*	0	-0,24*	0,04	0,07	0,27*	-0,01	0,01	0,39*	0,1	-0,08	0,21	0	0,92***										
<b>Atr</b>	0,04	0,46***	-0,07	-0,27*	0,31*	0,24*	0,13	-0,09	0,09	-0,04	-0,2	0,24*	0,08	-0,06	-0,01	-0,05	-0,09									
<b>Smz</b>	0,36*	0,35*	0,13	-0,22*	0,2	0,28*	-0,02	-0,08	0,17	0,01	-0,15	0,1	0,01	-0,12	0,07	-0,03	-0,03	0,19								
<b>Tba</b>	0,46***	0,43***	0,32*	-0,17	0,19	0,44***	-0,19	-0,23	0,23*	-0,09	-0,26*	-0,19	0,28*	-0,14	0,08	-0,04	-0,08	0,01	0,62***							
<b>Met</b>	0,28*	0,35*	0,23*	-0,12	0,12	0,37**	-0,17	-0,1	0,22*	0,03	-0,06	-0,11	0,26*	-0,05	0,18	-0,05	0,02	-0,01	0,64***	0,83***						
<b>Cpf</b>	0,15	-0,38**	-0,06	-0,07	0,15	-0,16	-0,07	-0,11	-0,14	0,04	-0,24*	-0,02	-0,37*	-0,16	-0,14	-0,05	-0,08	-0,05	-0,09	-0,1	-0,1					
<b>End</b>	-0,03	-0,11	-0,17	0,26*	0,03	0,06	0,03	-0,04	-0,12	-0,07	-0,18	-0,14	0,02	-0,14	-0,15	-0,05	-0,08	-0,18	-0,14	-0,14	-0,16	0,08				
<b>Fe</b>	-0,34*	-0,17	-0,07	0,14	-0,37**	0,12	0,2	0,61***	0,11	0,36*	0,64***	0,28*	-0,15	0,65***	0,33*	0	0,24*	-0,18	-0,07	-0,13	0,12	-0,17	-0,08			
<b>Mn</b>	0,1	-0,16	0,01	0,06	0,08	0,29*	0,1	0,48***	0,16	0,09	0,16	0,2	0,04	0,18	0,21	0,05	0,07	-0,09	0,03	-0,07	0,11	-0,05	0,17	0,33*		
<b>As</b>	-0,24*	-0,17	-0,27*	0,19	-0,02	0,12	0,25*	0,6***	-0,03	0,18	0,36**	0,26*	-0,09	0,53***	0,25*	-0,02	0,08	-0,1	-0,27*	-0,38**	-0,29*	-0,11	0,13	0,4**	0,19	

### I.3.7.2. Análises de Componentes Principais/Análise de Factores (ACP/AF)

Foi aplicada a ACP aos parâmetros organizados em matrizes de  $n$  parâmetros por  $t$  locais de amostragem. O resultado final desta análise resulta numa ordenação gráfica de parâmetros e locais de amostragem em espaço reduzido.

A análise de componentes principais seguida de análise de factores pela rotação *varimax* foi aplicada à matriz de dados normalizada e permitiu identificar oito componentes principais (CPs), pelo critério de Kaiser (Kaiser, 1960). No entanto, observou-se que o sétimo e o oitavo CP não apresentavam fontes de variância significativas, uma vez que não se registou nenhum valor próprio superior a 0,5. Assim, estes PC foram rejeitados e a rotação *varimax* foi realizada nos seis primeiros PCs. Os resultados da ACP/AF, incluindo os coeficientes de correlação entre as variáveis iniciais (atributos) e os varifactores (VF) e os valores próprios de cada VF estão resumidos na Tabela I.6. Os seis VF explicam 64% da variância total. O VF1 explica 20% da variância, e está fortemente correlacionado com o fósforo total, oxidabilidade e Fe e moderadamente correlacionado com a amónia, o azoto kjeldahl, carbono orgânico total, Mn e As. A presença destes parâmetros em elevadas quantidades pode ser atribuída a poluição antropogénica. Assim, no caso da albufeira, as fontes de poluição tópica classificadas como muito importantes, incluem efluentes domésticos urbanos e indústrias (queijarias, suiniculturas e boviniculturas) (PROCESL, 2003). A elevada quantidade de nutrientes pode ser devida à aplicação de estrume nas actividades agrícolas que são uma das fontes de poluição difusa mais importante na albufeira (Terceiro *et al.*, 2008). Para além disso, o fósforo total, também pode ser resultante dos efluentes de domésticos, e de efluentes industriais de adegas, uma vez que é um importante componente dos detergentes. Estes parâmetros encontram-se todos correlacionados positivamente na matriz de correlações de *Pearson*. O ferro pode ser resultante de fontes de poluição tópica, provenientes de efluentes industriais de minas, nomeadamente de Vila Ruiva (Moura), Algares (Portel) e Azeiteiros (Campo Maior) (Matos e Martins, 2006). O VF2 explica 15% da variância total e é fortemente correlacionado com os herbicidas (simazina, terbutilazina e metolacoloro).

Estes compostos resultam da lixiviação dos solos expostos à intensa actividade agrícola praticada no Alentejo.

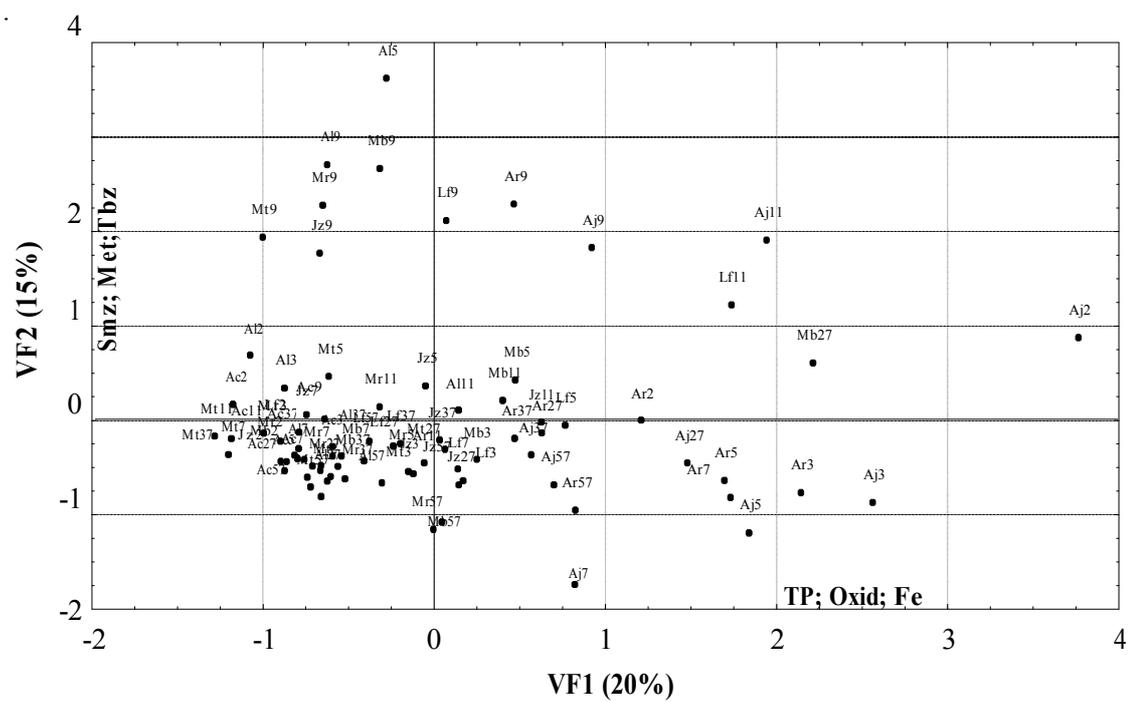
Dos herbicidas identificados, a simazina e o metolacloro integram a lista dos principais poluentes com descargas significativas provenientes de fontes difusas na Bacia Hidrográfica do Guadiana (IA, 2005). VF3 explica 9% da variância total e está fortemente correlacionado com os parâmetros microbiológicos resultantes principalmente da descarga de efluentes domésticos e/ou dos dejectos de animais em pastoreio. O VF4 (7%) é principalmente, descrito pelos cloretos e está moderadamente correlacionado com a temperatura, o clorpirifos e a CBO<sub>5</sub>. O VF5 (%) é principalmente descrito pelo pH, redox, amónia e CBO<sub>5</sub>. O VF6 explica 6% da variância total e está fortemente correlacionado com a atrazina. Os VF1, VF2, VF3 e VF6 são maioritariamente explicados por descritores orgânicos, nutrientes, parâmetros microbiológicos e herbicidas, ou seja, por parâmetros cuja presença, em concentrações elevadas, pode ser atribuída a poluição antropogénica. O VF4 e VF5 são explicados maioritariamente por parâmetros hidrogeoquímicos por isso estão relacionados com as características geológicas dos solos que a água atravessa e com as características iónicas das águas das chuvas.

**Tabela I.6.** Coeficientes de correlação das 26 variáveis iniciais (atributos) nos seis VFs obtidos no estudo.

	VF1	VF2	VF3	VF4	VF5	VF6
pH	-0,242	0,444	-0,126	-0,033	0,668*	-0,036
T	-0,097	0,333	-0,014	0,625*	0,118	-0,484
CE	-0,157	0,421	-0,508*	0,127	0,147	0,001
OD	0,121	-0,161	0,048	0,020	-0,291	0,533*
Redox	-0,185	0,014	0,218	0,309	0,675*	-0,144
CBO <sub>5</sub>	0,346	0,346	-0,042	0,528*	0,522*	-0,149
CQO	0,434	-0,261	0,003	-0,133	0,376	-0,259
Pt	0,849**	-0,146	-0,136	-0,135	0,028	0,031
NK	0,323	0,267	0,025	0,394	0,265	-0,217
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	0,513*	0,170	0,111	-0,384	-0,209	-0,160
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	0,555*	-0,104	-0,296	0,015	-0,572*	0,096
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0,486*	0,035	-0,102	-0,463	-0,064	-0,384
Cl <sup>-</sup>	-0,109	0,145	0,037	0,864**	0,075	0,054
Oxid	0,816**	-0,092	-0,061	0,103	-0,098	-0,074
COT	0,502*	0,284	0,100	0,120	-0,170	0,012
T. Coli	0,011	-0,040	-0,933**	-0,016	-0,023	-0,004
Ent. F	0,168	-0,037	-0,934**	-0,013	-0,073	0,018
Atr	-0,058	-0,068	0,093	0,129	0,170	-0,769**
Smz	-0,025	0,727**	0,047	-0,058	0,151	-0,233
Tba	-0,161	0,858**	0,030	0,202	0,119	-0,007
Met	0,030	0,877**	0,033	0,164	0,005	0,055
Cpf	-0,199	-0,048	0,080	-0,574*	0,332	0,145
End	-0,033	-0,253	0,123	0,052	0,302	0,519*
Fe	0,769**	0,072	-0,071	-0,036	-0,290	0,136
Mn	0,512*	0,094	-0,065	-0,011	0,364	0,342
As	0,643*	-0,409	0,059	0,064	0,050	0,108
Valor Pr óprio	4,381	3,229	2,261	2,533	2,417	1,954
Variância (%)	20,25	14,71	8,932	7,320	7,072	6,232
Variância Acumulada (%)	20,25	34,96	43,89	51,21	58,29	64,52

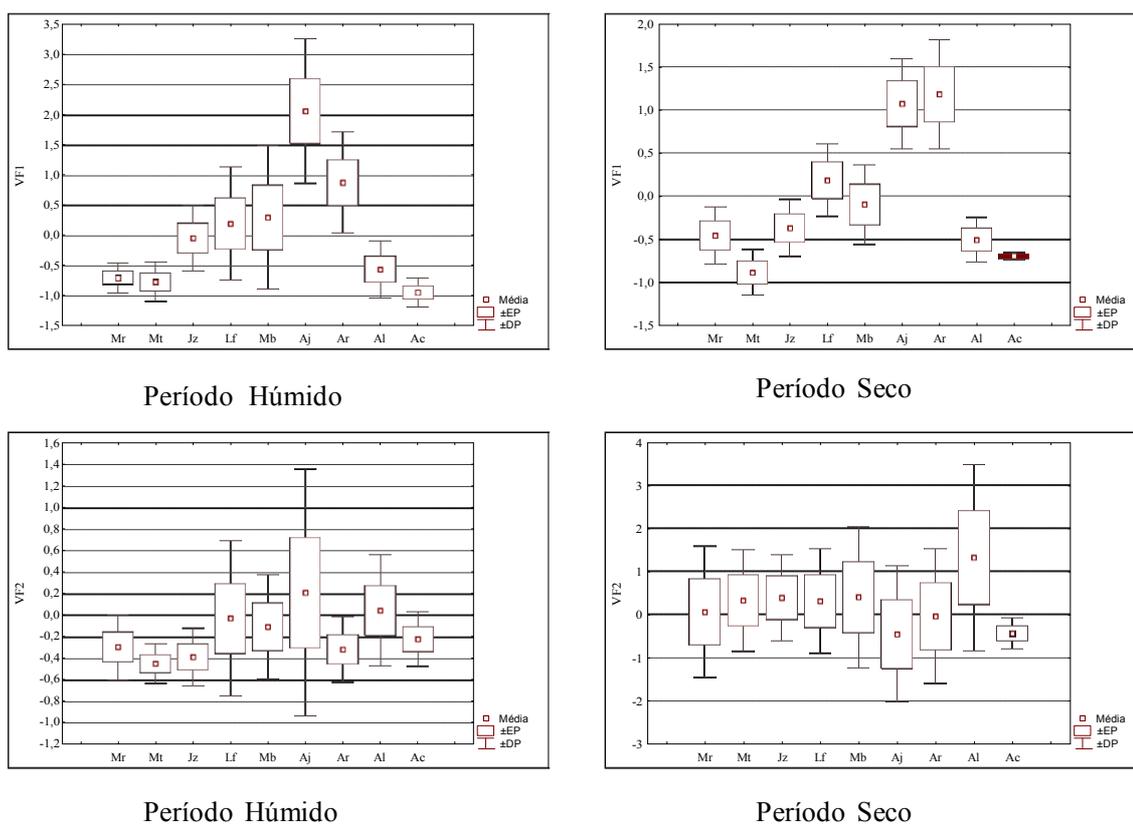
Para estabelecer o grau de significância das correlações seguiu-se a classificação proposta por Liu *et al.* (2003): (\*) parâmetros moderadamente correlacionados com o VF; (\*\*) parâmetros fortemente correlacionados com o VF.

Na Figura I.15 podemos observar a distribuição bidimensional dos atributos definidos no VF1 (oxidabilidade, fósforo total e ferro) e no VF2 (simazina, metolacoloro, terbutilazina). Valores positivos no VF1 e VF2 indicam amostras com concentrações consideráveis de nutrientes, descritores orgânicos, ferro e herbicidas. Neste quadrante encontramos as amostras com água de pior qualidade. As amostras mais influenciadas por herbicidas e menos influenciadas por descritores orgânicos situam-se no quadrante positivo do VF2 e negativo do VF1, a maioria destas amostras pertence ao período seco (77%). As amostras projectadas no quadrante negativo de ambos os VFs (58% do total das amostras) são as que apresentam melhor qualidade, 60% das quais correspondem a amostras do período húmido.



**Figura I.15.** Projecção das amostras no plano principal formado pelo 1º e 2º varifactores (VF1 e VF2).

Recorreu-se a gráficos do tipo *Box-and-Wisker* para a representação da projecção das amostras nos dois eixos principais (VF1 e VF2), com o objectivo de identificar quais os locais que sofrem maior influência dos parâmetros que descrevem os dois eixos. Foram utilizados, dois critérios de diferenciação, nesta representação gráfica: variação temporal (período seco e período húmido) e local. Este método permite detectar a presença de *outliers* e notar comportamentos assimétricos no vector de dados. Pela análise da Figura I.16, podemos verificar que em ambos os períodos, os locais de amostragem mais afectados pelos parâmetros que descrevem o VF1 foram Sra. Ajuda e Ardila. Todos os locais foram mais influenciados pelos descritores orgânicos e nutrientes no período húmido. No período húmido, por ordem crescente de influência, temos Ac<Mt<Mr<Al<Jz<Lf<Mb<Ar<Aj, ou seja o local menos influenciado por estes parâmetros foi Alcarrache e o mais influenciado foi Ajuda. No período seco e apesar da diferença entre os locais de amostragem não ser acentuada, a influência dos parâmetros de maior peso no eixo principal 1 foi exercida da seguinte forma Mt<Ac<Al<Mr<Jz<Mb<Lf<Ar<Aj, ou seja, o local que no período seco sofreu menor influência, dos parâmetros que explicam o VF1, foi Montante e o que sofreu maior influência foi Ardila. Podemos ainda verificar que os três locais de amostragem em ambos os períodos mais afectados por descritores orgânicos e nutrientes, durante o estudo foram Ajuda, Ardila e Lucefecit. Esta análise confirma a maior contaminação, por matéria orgânica e nutrientes, a montante e nos afluentes da albufeira (Ar, Aj, Lf), ocorrendo uma diminuição da contaminação na albufeira (Mt, Ac, Al). A contaminação tende novamente a aumentar a jusante (Jz). O VF2 foi explicado maioritariamente por herbicidas, em ambos os períodos ocorreu uma grande variabilidade no que respeita à influência exercida por estes parâmetros nos vários locais de amostragem, embora essa influência seja muito mais acentuada no período seco. Devido à elevada variabilidade registada, as diferenças encontradas não são representativas de padrões de variabilidade marcadas, no entanto em ambos os períodos os locais mais influenciados por herbicidas forma Sra. Ajuda e Álamos.



**Figura I.16.** Representação gráfica do tipo *Box-and-Wisker* referente à projecção das amostras nos dois principais varifactores, tendo em consideração a variabilidade temporal e o local. **(a)** VF 1 (descritores orgânicos, nutrientes, ferro); **(b)** VF2 (herbicidas).



#### **I.4. Conclusão**

Os resultados deste estudo permitiram concluir que os parâmetros responsáveis pela variabilidade da qualidade da água, no período em estudo, foram matéria orgânica, nutrientes, contaminantes fecais e herbicidas.

No que respeita aos metais, o facto das situações desfavoráveis corresponderam, a ocorrências esporádicas, leva-nos a concluir não estarmos perante situações preocupantes de carácter estrutural no que respeita a estes parâmetros, pelo menos na actualidade.

Os resultados deste estudo permitiram ainda caracterizar uma situação de alguma de degradabilidade da qualidade da água superficial da albufeira com incidência em parâmetros que habitualmente estão correlacionados com a presença de águas residuais não tratadas ou insuficientemente tratadas contendo matéria orgânica, nutrientes e bactérias fecais em elevadas concentrações. A inexistência de sistemas de tratamento de águas residuais industriais, nas indústrias da área circundante à bacia é um dos principais factores que promove a degradabilidade da massa de água em estudo. Por outro lado, as características da massa de água a montante também estão muito dependentes da forte contaminação proveniente de Espanha.

A contaminação por pesticidas ocorreu principalmente a montante da bacia e na albufeira e é resultante da aplicação de fitossanitários nas culturas agrícolas, nomeadamente na vinha e nos olivais. Com a implementação de culturas em intensivo, as fontes de poluição difusa na área circundante à albufeira tendem a aumentar provavelmente com o conseqüente aumento dos quantitativos de pesticidas na massa de água. Este é um dos factores mais preocupantes da qualidade da água da albufeira, pois pode pôr em causa a saúde das populações e das comunidades aquáticas do ecossistema em estudo.



## **CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZAÇÃO INTEGRADA DA QUALIDADE DA ÁGUA DA ALBUFEIRA DO ALQUEVA: PARÂMETROS ECOTOXICOLÓGICOS**



## Resumo

A avaliação do grau de contaminação dos ambientes aquáticos não deve ter só em consideração a caracterização química das massas de água, mas deve ser complementada por ensaios biológicos, que determinam potenciais efeitos tóxicos e que permitem uma avaliação integrada dos efeitos nas populações e nas comunidades do ecossistema aquático. Este estudo apresenta os resultados ecotoxicológicos da caracterização da água da albufeira do Alqueva. O objectivo do estudo foi a caracterização da qualidade da água baseada no seu perfil toxicológico bem como a avaliação da sensibilidade dos bioindicadores utilizados. O estudo integrou uma bateria de ensaios agudos e crónicos com as espécies *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* e *Daphnia magna*. No estudo toxicológico agudo a espécie mais sensível foi o *T. platyurus*, que detectou um maior número de amostras tóxicas no período seco. No que respeita ao *V. fischeri*, os resultados mostraram que esta espécie foi mais sensível a amostras provenientes do período húmido. O coeficiente de *Spearman* mostrou que a inibição da luminescência do *V. fischeri* está positivamente correlacionada com o fósforo total, clorpirifos, ferro e arsénio, enquanto a mortalidade do *T. platyurus*, está positivamente correlacionada com os parâmetros de pH, carência bioquímica de oxigénio, cloretos, atrazina, simazina, terbutilazina e endossulfão sulfato. Apesar da exposição aguda, a amostras de água da albufeira, não promoverem qualquer efeito tóxico ao crustáceo *D. magna*, a exposição crónica promoveu um significativo decréscimo do número de juvenis por *Daphnia*, principalmente, em amostras do período seco. O coeficiente de *Spearman* mostrou que o número de juvenis por *Daphnia* está negativamente correlacionado com o pH, carência bioquímica de oxigénio, cloretos, atrazina, simazina, terbutilazina e endossulfão sulfato. Este estudo evidenciou a toxicidade de uma quantidade considerável de amostras de água provenientes da albufeira. Os locais a montante do troço de água foram os que apresentaram uma maior toxicidade.

Os resultados demonstraram que a utilização de indicadores de diferentes níveis tróficos e de ensaios agudos e crónicos permitiu a identificação de vários perfis de toxicidade correspondentes a variabilidade espacial e temporal da qualidade da água, promovida por fontes naturais ou antropogénicas. Este estudo evidenciou a necessidade da implementação de baterias de ensaios toxicológicos nos programas de caracterização de qualidade de água superficial.

## II.1. Introdução

A avaliação da qualidade de água, proveniente de albufeiras, é imprescindível para a implementação de programas de remediação com o objectivo último de minimizar o risco ambiental induzido por substâncias perigosas no ecossistema aquático (Koukal *et al.*, 2004).

A avaliação do grau de contaminação dos ambientes aquáticos tem sido feita maioritariamente através da análise química dos poluentes (USEPA, 1992). Este tipo de análise na maioria dos casos não é suficiente para o controlo da qualidade da água e deve ser complementada com dados ecotoxicológicos (Forget *et al.*, 2000). Para além disso, a avaliação de risco com base na caracterização físico-química e na quantificação de substâncias perigosas, não reflecte o risco das misturas de contaminantes nas águas superficiais (Brack *et al.*, 2007). A aplicação de uma abordagem integrada nos programas de caracterização da qualidade da água permite uma avaliação mais completa dos efeitos induzidos por todos os compostos que se encontram na massa de água, incluindo os devidos a compostos não identificados e a reacções de antagonismo, potenciação ou sinérgicas (Okamura *et al.*, 1996). A Directiva Quadro da Água enfatiza a necessidade de avaliação ecotoxicológica para a análise do estado ecológico do ecossistema em estudo (Brack *et al.*, 2005).

A avaliação da qualidade da água superficial por ensaios genotóxicos *in vivo* e *in vitro* já é proposta em vários estudos (Ohe *et al.*, 2004; Cardozo *et al.*, 2006; Pellacani *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2008). No entanto, poucos estudos fazem referência à avaliação da qualidade da água superficial, recorrendo a ensaios ecotoxicológicos agudos e crónicos (Diaz-Baez *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2008). Este é o primeiro estudo na albufeira do Alqueva que integra a componente ecotoxicológica da massa de água não havendo, por isso, qualquer informação disponível sobre o possível impacto dos poluentes no ecossistema aquático da albufeira. Os objectivos deste estudo foram: (i) avaliar o potencial ecotoxicológico da albufeira do Alqueva; (ii) estabelecer possíveis correlações entre os poluentes detectados na albufeira e os efeitos tóxicos observados; (iii) determinar quais os bioindicadores mais sensíveis para integrarem futuros programas de avaliação de risco ambiental na albufeira.

## **II.2. Material e Métodos**

### II.2.1. Área de Estudo

A área de estudo, os locais e os meses de amostragem foram descritos na secção material e métodos do capítulo I.

### II.2.2. Parâmetros Analisados

Dos 26 parâmetros avaliados no estudo foram seleccionados para a presente análise parâmetros de estratificação (temperatura, pH), de mineralização (cloretos), nutrientes (fósforo total e nitratos), matéria orgânica (carência bioquímica de oxigénio (CBO<sub>5</sub>)), metais totais (As, Fe, Mn) e pesticidas (atrazina, simazina, terbutilazina), clorpirifos, endossulfão sulfato).

Os parâmetros analisados, o procedimento de campo e as metodologias analíticas utilizadas, foram descritos na secção material e métodos do capítulo I.

### II.2.3. Ensaio Ecotoxicológicos

As amostras de água utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos foram filtradas com filtros de membrana de 0,45 µm, e em seguida congeladas a -18°C, até à realização dos testes.

Os ensaios agudos foram realizados com três espécies de dois níveis tróficos distintos: *V. fischeri* (bactéria marinha), *D. magna* e *T. platyurus* (crustáceos). Os ensaios crónicos foram realizados com a espécie *D. magna*.

Os ensaios com *V. fischeri* e *T. platyurus* foram realizados com acesso a organismos dormentes ou formas larvares. Assim, os ensaios com *V. fischeri* foram realizados a partir da reactivação de bactérias liofilizadas em cloreto de sódio (NaCl) a 2%. As larvas de *T. platyurus* foram obtidas através da eclosão de quistos incubados no meio de cultura, fornecido pelo kit (*Standard Artificial Freshwater*). O meio de cultura utilizado para a eclosão das larvas de *T. platyurus* é constituído por: hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>); sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>); sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e cloreto de potássio (KCl) diluídos em água desionizada (Personne, 1999).

Os ensaios com *D. magna* foram realizados com organismos obtidos a partir de culturas a decorrer no laboratório.

#### II.2.3.1. Meio de Cultura e Cultura de *Daphnia magna*

O meio de cultura para a manutenção em laboratório da espécie *D. magna* é o “ASTM hard water” (ASTM, 1998), enriquecido com o extracto orgânico Marine “25”<sup>®</sup>, um extracto proveniente da alga *Ascophyllum nodosum* (Baird *et al.*, 1989a), numa concentração de 4,0 ml L<sup>-1</sup>. A composição do ASTM está descrita na Tabela II.1.

**Tabela II.1.** Composição química, pH e dureza do meio de cultura (ASTM hard water) (Soares, 1989)

Composto químico	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
NaHCO <sub>3</sub>	19,20
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	24,55
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,40
KCl	0,80
pH	7,5-8,0
Dureza (em mg L <sup>-1</sup> de CaCO <sub>3</sub> )	160-180

NaHCO<sub>3</sub> (hidrogenocarbonato de sódio); CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (sulfato de cálcio dihidratado);

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (sulfato de magnésio heptahidratado); KCl (cloreto de potássio).

No decorrer do trabalho, o meio foi preparado em água ultra-pura (condutividade <5 µS cm<sup>-1</sup>). Para 20 L de ASTM foram utilizados 200 ml de cada uma das soluções de NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e KCl e 2,4 g de CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.

O aditivo orgânico foi adicionado com a finalidade de suprir as necessidades em oligoelementos dos organismos.

Os organismos foram alimentados com *Pseudokirchneriella subcapitata*, que é uma alga que permite o bom desenvolvimento da espécie *D. magna* e é recomendada pela OCDE (1998). Esta alga verde foi mantida no laboratório, sob luz contínua de lâmpadas fluorescentes (2000 lux) e em condições de asséptica. As culturas destinadas à produção de alimento foram cultivadas em meio líquido, designado por “Woods Hole MBL” (pH=7.2) (Stein, 1973) (Fig. II. 1). A quantidade administrada como alimento corresponde a uma densidade de 3,0x10<sup>5</sup> cel mL<sup>-1</sup> *Daphnia*<sup>-1</sup> (equivalente a 2,65 mg C mL<sup>-1</sup>).



**Figura II.1.** Cultura de *P. subcapitata* mantida no laboratório.

As culturas de *D. magna* foram mantidas a uma temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e um fotoperíodo de 16h luz: 8h escuro, num volume de 800 mL de ASTM, com uma densidade de 15 organismos por frasco. Os meios foram renovados em intervalos de 48h e as culturas alimentadas diariamente. As fêmeas foram mantidas até à 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> ninhada, altura em que eram iniciadas novas culturas a partir de juvenis recém-nascidos.

#### II.2.3.2 Teste de Inibição da Luminescência com a bactéria *V. fischeri*

Este método foi preconizado conforme o protocolo do “DR LANGE luminescent bacteria test” que segue o procedimento ISO 11348-2 (1998). O ensaio baseia-se na medição da inibição da luminescência de uma suspensão de bactérias liofilizadas da estirpe NRRL-B-11177, quando em presença de uma série de diluições de amostra de água (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100% (v/v)) em NaCl a 2%. Determinou-se a inibição da emissão de luz da suspensão de inóculo das bactérias quando em presença da amostra de água em comparação com um controlo não tóxico – NaCl a 2%, a uma temperatura de  $15 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . O pH das amostras foi mantido entre 6,5-7,0. Para cada amostra a bioluminescência foi lida antes e depois do período de incubação (30 minutos).

Foi realizado um teste de referência com dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) como controlo positivo. A sensibilidade dos organismos testados encontrava-se de acordo com o protocolo. Foram determinados os valores de  $EC_{50}$  (%) de cada amostra, considerando como parâmetro de avaliação a percentagem de inibição de luz.

### II.2.3.3 Teste de mortalidade com o crustáceo *T. platyurus*

Este teste tem como objectivo determinar o efeito de substâncias contaminantes presentes em amostras de água, na mortalidade do crustáceo *T. platyurus* (Fig. II.2), após 24 horas de exposição. O teste foi executado conforme o protocolo da MicroBioTests Inc® (Persoone, 1999). Foram utilizados neonatos com idade inferior a 24h, obtidos a partir da eclosão de quistos de *T. platyurus*. Os quistos foram incubados em 1,0 mL de meio de cultura durante 18 a 22 horas, a uma temperatura de  $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$  e uma intensidade de luz contínua de cerca de 4000  $\pm$  1000 lux. Após a eclosão transferiu-se, ao microscópio, 10 larvas para cada câmara da placa teste. As diluições foram 12,5%; 25%; 50%; 75% e 100%. Realizaram-se quatro réplicas por concentração. As placas permaneceram na estufa à temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}C$ , ao abrigo da luz, durante 24 horas. Foi realizado um teste de referência com dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) como controlo positivo. A sensibilidade dos organismos testados encontrava-se de acordo com o protocolo. Foram calculados os valores de  $EC_{50}$  (%), considerando como parâmetro de avaliação a percentagem de mortalidade dos organismos-teste.



**Figura II.2.** Organismo pertencente à espécie *T. platyurus*.

#### II.2.3.4. Teste de Inibição de Mobilidade/Mortalidade com *D. magna*

Este teste tem como objectivo determinar o efeito de substâncias contaminantes presentes em amostras de água na imobilidade do crustáceo *D. magna*, após 48 horas de exposição. O teste segue o protocolo descrito na norma ISO 6341 (1996).

Foram usados neonatos com idade inferior a 24 horas isolados de uma cultura controlada de origem entre o 3º e o 5º nascimento, pertencentes a um clone (clone F) (Baird *et al.*, 1989b). Os juvenis foram mantidos em grupos de cinco indivíduos, em copos de vidro de 25 ml, com diferentes diluições de amostra e ASTM, durante 48 horas, a uma temperatura de 20 °C e com fotoperíodo de 16h luz : 8h escuro. Durante o teste os juvenis não foram alimentados. Utilizou-se ASTM como controlo negativo e quatro réplicas por cada concentração de ensaio (12,5%; 25%; 50%; 75% e 100%) realizado. Durante o teste foram controlados os parâmetros: temperatura, pH, oxigénio dissolvido e condutividade. A concentração de imobilização/mortalidade de 50% dos organismos usados ( $EC_{50}$ ) foi calculada em função do número total inicial de organismos.

#### II.2.3.5. Teste de reprodução com *D. magna*

O teste de reprodução tem como finalidade avaliar o efeito das amostras de água no crescimento e reprodução do crustáceo *D. magna*. O teste segue o protocolo da OCDE 211 (1998). Neste ensaio utilizamos amostras provenientes das campanhas de Novembro 2006 e Fevereiro 2007 para caracterizar o período húmido e de Julho e Setembro de 2006 para caracterizar o período seco. Foram utilizados juvenis, entre o 3º e o 5º nascimento pertencentes a um clone (clone F), com idade inferior a 24h, isolados de uma cultura controlada de origem (Baird *et al.*, 1989b). Os juvenis foram mantidos individualmente, num volume de 50 ml, com diferentes diluições de amostra de água. As diluições foram baseadas nos resultados do teste de imobilização (25, 50, 75 e 100%).

Nos ensaios utilizou-se como controlo negativo ASTM e dez réplicas por cada diluição da amostra (Fig. II.3). Os animais foram transferidos para meio novo de dois em dois dias. A alimentação diária foi feita com *P. subcapitata* numa densidade de  $3,0 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> *Daphnia*<sup>-1</sup> (equivalente a 2,65 mg C mL<sup>-1</sup>) e com 4 ml de aditivo orgânico (*A. nodosum*) (Baird *et al.*, 1989a). A inibição da reprodução foi avaliada pelo número total de juvenis viáveis produzidos por *Daphnia*, em cada concentração, durante os 21 dias do ensaio. Durante o teste foram controlados os parâmetros: temperatura, pH, oxigénio dissolvido e condutividade, não havendo necessidade de correcção de nenhum destes parâmetros.

Foi realizado o teste de referência com o K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> como controlo positivo. O valor de EC<sub>50</sub> às 24 horas encontrava-se dentro do intervalo de valores (0,6 – 1,7 mg L<sup>-1</sup>) descritos no protocolo.

O efeito das amostras de água da albufeira na reprodução foi avaliado com base no número total de juvenis viáveis por fêmea por tratamento.



**Figura II.3.** Ensaio crónico com *D. magna*.

#### II.2.4. Análise Estatística

Calculou-se a concentração que promove efeito em 50% dos organismos ( $EC_{50}$  (%)), para os ensaios com *T. platyurus* e *D. magna* em função do número total de organismos inicial, utilizando o “Método Probit” (Finney, 1971). No teste de inibição da bioluminescência com *V. fischeri*, os valores de  $EC_{50}$  (%), foram calculados usando o software LUMISsoft 4™.

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos crônicos foram submetidos à análise de homogeneidade de variâncias através do teste de *Kolmogorov-Smirnov* (Sokal e Rohlf, 1995) e, quando possível, sujeitos a análise de variância unifatorial (One-Way ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla com o controlo pelo método de Dunnett’s ( $p < 0,05$ ) (Zar, 1996). Dados que não satisfizeram os requisitos de homogeneidade de variâncias foram analisados pelo teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis on Ranks*. Quando diferenças entre tratamentos foram encontradas utilizou-se um teste *post-hoc* de comparações múltiplas com o controlo pelo método de *Dunnett’s* ( $p < 0,05$ ) (Zar, 1996).

A correlação de *Spearman* foi utilizada para avaliar as possíveis associações entre os parâmetros físico-químicas das amostras de água (de cada estação de amostragem em cada período (húmido ou seco)) e os efeitos agudos e crônicos observados, para um nível de significância  $p < 0,05$  (Wunderline *et al.*, 2001).

### II.3. Resultados e Discussão

Os resultados dos parâmetros físico-químicos foram analisados com base nos valor máximo admissível (VMA) e valor máximo recomendado (VMR) pela Legislação Portuguesa (Decreto-Lei nº 236/98) adaptada da Directiva Comunitária de 75/440/CE (ECC, 1975). Para a avaliação do risco induzido por pesticidas utilizámos os padrões de qualidade ambiental (PQA), propostos recentemente pela Comissão Europeia (ECC, 2007).

A variação espacial e temporal dos parâmetros químicos e dos pesticidas quantificados encontram-se representados na Figura II.4. As concentrações de cloretos atingiram valores superiores no período seco sem nunca ultrapassarem o VMR. O descritor orgânico  $\text{CBO}_5$  atingiu valores que excederam o VMR na maioria das estações de amostragem principalmente, no período seco. A análise da variação espacial do  $\text{CBO}_5$  permitiu concluir que as concentrações mais elevadas deste parâmetro ocorreram em Sra. Ajuda ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) e Lucéfecit ( $16 \text{ mg L}^{-1}$ ), ambas localizadas a montante da albufeira e em Ardila ( $14 \text{ mg L}^{-1}$ ) um dos afluentes ao sistema. Os nutrientes (fósforo total e nitratos) foram detectados em maiores concentrações no período húmido. Os nitratos não ultrapassaram o máximo admissível em nenhum local. No que respeita, ao fósforo total este parâmetro excedeu o VMR em Sra. Ajuda ( $1\,777 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Ardila ( $1\,124 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Moinho das Barcas ( $883 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e Jusante ( $833 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A variação temporal dos metais totais mostrou que estes compostos apresentaram concentrações mais elevadas no período húmido, nos locais de Lucéfecit, Sra. Ajuda, Jusante e Ardila.

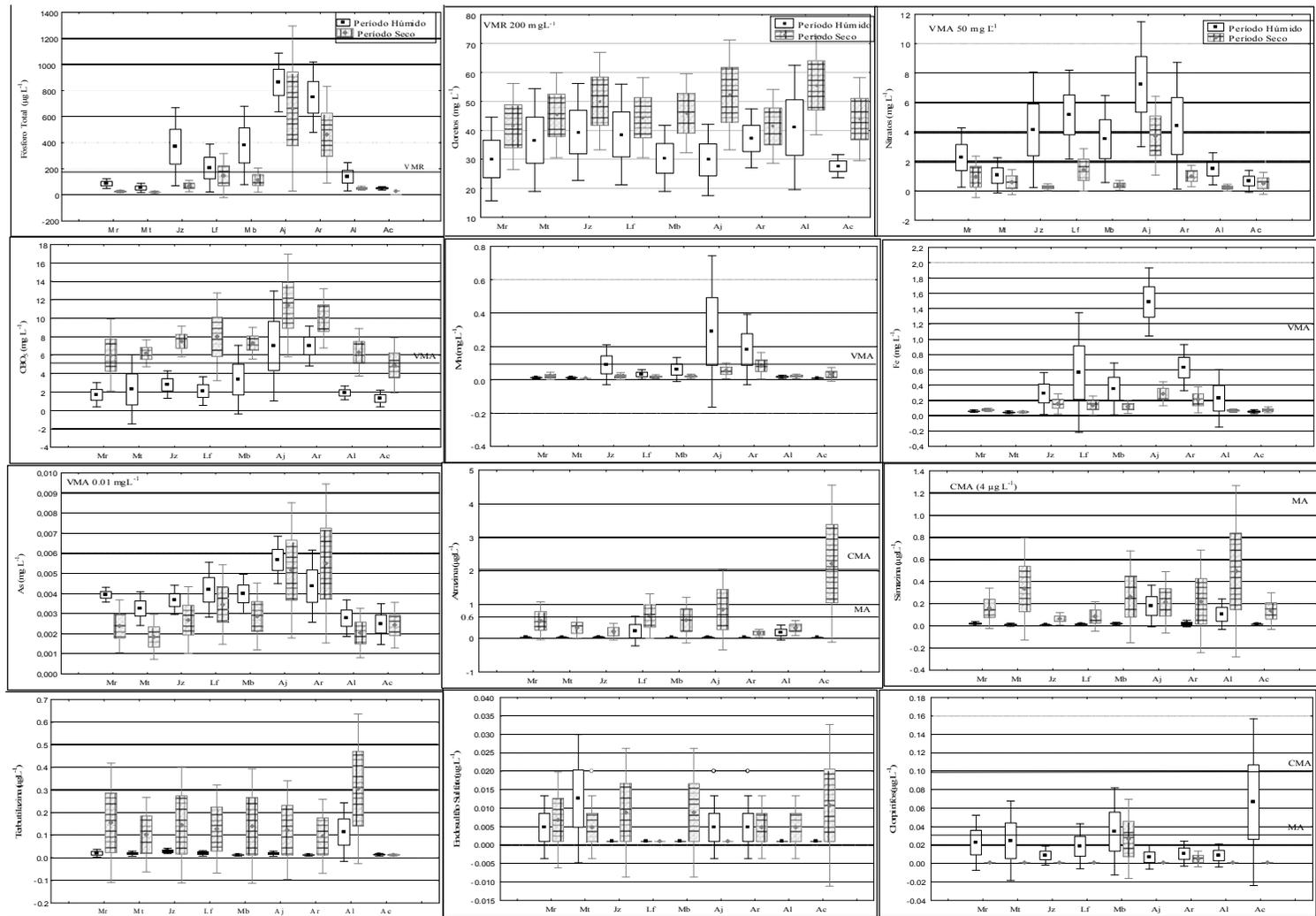
Dos pesticidas quantificados na albufeira verificou-se que a atrazina e a simazina foram os compostos que atingiram concentrações mais elevadas durante o período de estudo. A análise temporal mostrou que as maiores concentrações destes pesticidas foram detectadas no período seco. A análise espacial permitiu concluir que locais mais afectados pela atrazina foram Alcarrache ( $5,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e Sra. Ajuda ( $2,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ), ultrapassando a CMA e a média anual MA propostas pela União Europeia.

A máxima concentração registada de simazina ocorreu em Maio de 2007, em Álamos com um valor de  $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$ , ultrapassando nessa ocasião a MA proposta para este herbicida. Estes resultados estão em concordância com outros estudos realizados em bacias hidrográficas de Portugal e Espanha (Cerejeira *et al.*, 2003; Carabias-Martinez *et al.*, 2003).

O clorpirifos foi mais frequentemente detectado no período húmido, entre Fevereiro e Março. A máxima concentração quantificada deste organofosforado foi de  $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$  em Sra. Ajuda. Este pesticida ultrapassou a MA ( $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e a CMA ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em Alcarrache, Moinho das Barcas e Sra. Ajuda.

Tanto os herbicidas como o clorpirifos foram detectados em maiores concentrações no período correspondente à sua aplicação nos campos agrícolas, pois apresentam tempos de semi-vida pequenos, na água: 30-300 dias para a atrazina (Yoo e Solomon, 1981; Glotfelty *et al.*, 1984); 30-100 dias para a simazina (Glotfelty *et al.*, 1984, Comber, 1999); 200 dias para a terbutilazina (Green, 1991) e; 29 a 74 dias para a clorpirifos (Racke, 1993).

Em relação ao endossulfão sulfato os resultados mostraram que as concentrações na albufeira são muito similares não sofrendo variação acentuada ao longo do tempo. Este facto pode indicar que este pesticida persiste na massa de água o que pode resultar num potencial risco ambiental para o ecossistema aquático em estudo. Este pesticida foi detectado em concentrações entre  $0,01-1,80 \mu\text{g L}^{-1}$ , valores similares ao descrito por outros autores (Cerejeira *et al.*, 2003; Leong *et al.*, 2007).



**Figura II.4.** Distribuição espacial e temporal dos parâmetros químicos através da representação do tipo *Box-and-Whisker*. O VMR e o VMA do Decreto-Lei nº 236/98, MA e a CMA (ECC, 2007) estão representados, sempre que possível, por uma linha a cheio.

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos agudos mostraram que o crustáceo *D. magna* foi a espécie menos sensível com mortalidades sempre inferiores a 10%. Os resultados dos ensaios agudos com o *V. fisheri* (Tabela II. 2) mostraram que a bactéria detectou um maior número de amostras tóxicas provenientes do período húmido. As amostras que promoveram um efeito tóxico mais acentuado nesta espécie foram as provenientes de Sra. Ajuda (30 min.  $EC_{50} = 22 \%$  (Fevereiro de 2006)), e Álamos (30 min.  $EC_{50} = 44 \%$  (Março de 2007)).

Os resultados do ensaio com o crustáceo *T. platyurus* (Tabela II.3) mostraram que esta espécie foi sensível a um maior número de amostras provenientes do período seco. Os locais da albufeira que apresentaram maior número de amostras tóxicas para este crustáceo foram Álamos, Alcarrache, Sra. Ajuda e Ardila.

Apesar da toxicidade aguda das amostras apresentar um perfil distinto de acordo com a espécie usada, as duas espécies forma bastante sensíveis a amostras de água provenientes de Sra. Ajuda e Álamos.

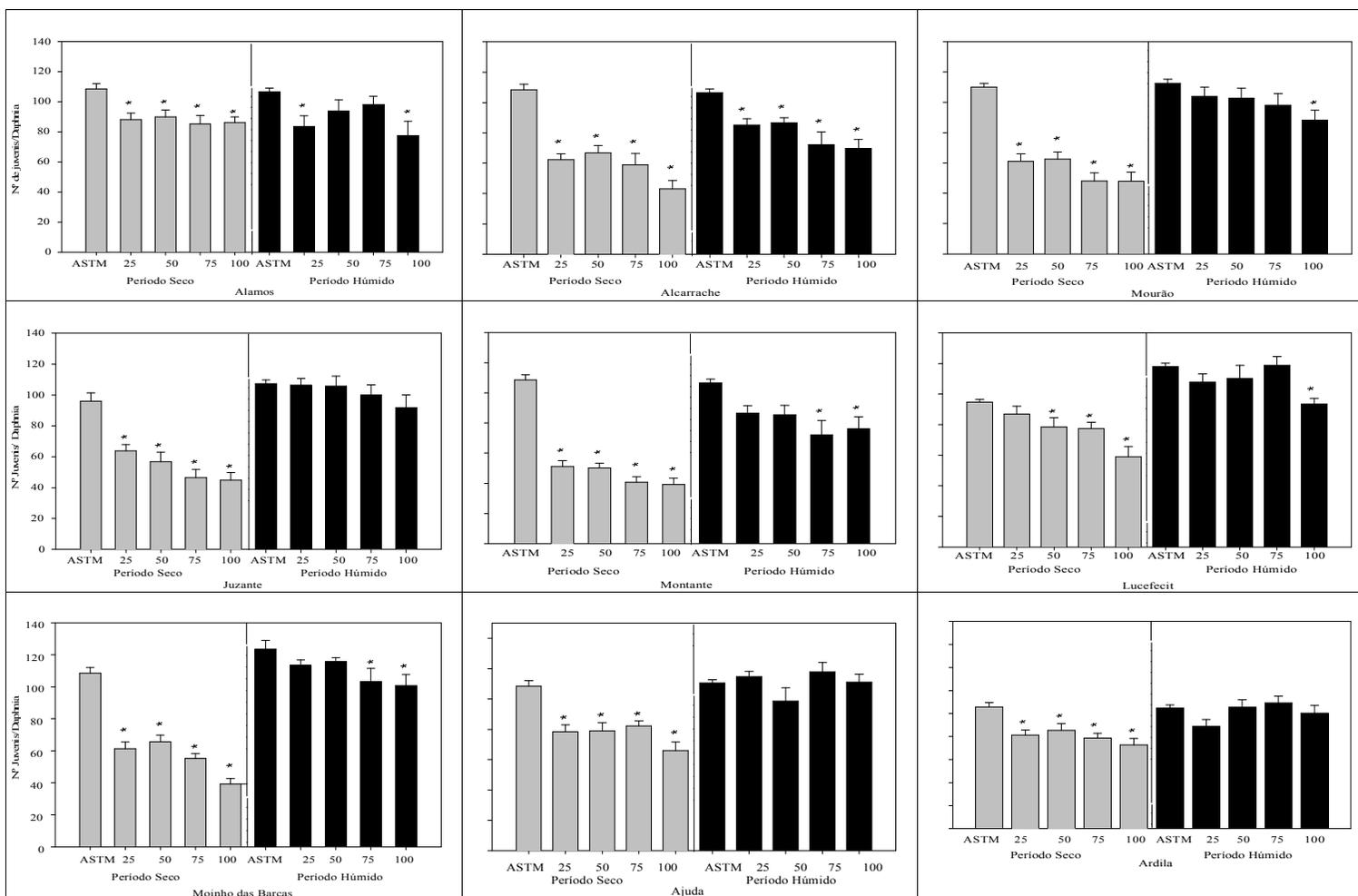
O crustáceo *D. magna* foi a espécie menos sensível na bateria de ensaios agudos utilizados. Alguns estudos em águas superficiais com baterias de bioindicadores confirmam estes resultados, concluindo que espécies como a *Hydra attenuata* e *T. platyurus* são mais sensíveis que a *Daphnia sp* (Diaz-Baez *et al.*, 2002; Mankiewicz-Boczek *et al.*, 2008). Os resultados deste estudo mostram que o ensaio agudo com *T. platyurus* pode ser uma boa alternativa ao ensaio com *D. magna* e pode justificar a introdução desta espécie em programas de avaliação de risco de águas superficiais, como já foi indicado por outros autores (Latif e Licek, 2004).

**Tabela II.2.** Valores de 30min-EC<sub>50</sub> (%) (média desvio padrão; n=2) para a bactéria *V. fischeri*, nos vários locais de amostragem ((Sra. Ajuda (Aj), Alcarrache (Ac), Álamos-Captação (Al), Alqueva-Montante (Mt), Alqueva-Mourão (Mr), Lucefecit (Lf), Alqueva-Jusante (Jz), Ardila-confluência (Ar) e Moinho das Barcas (MB)), durante o estudo.

		30 min-EC <sub>50</sub> (%)								
		Al	Ac	Mr	Mt	Jz	Lf	Mb	Aj	Ar
2006	Fevereiro	n.t.	n.t.	68±0,22	n.t.	57±0,15	60±0,97	n.t.	22±0,09	n.t.
	Ma rço	89±0,25	n.t.	n.t.	52±0,51	n.t.	n.t.	62±0,13	n.t.	n.t.
	Ma io	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	86±0,35	n.t.	n.t.	n.t.
	Julho	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	51±0,33	51±0,17
	Setem bro	65±0,43	n.t.	n.t.	n.t.	95±0,18	63±0,23	66±0,45	41±0,01	64±0,15
	Novem bro	66±0,39	84±0,46	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	79±0,26	76±0,69	n.t.
2007	Fevereiro	n.t.	n.t.	86±0,69	n.t.	n.t.	n.t.	59±0,20	62±0,33	n.t.
	Ma rço	44±0,36	84±0,26	n.t.	n.t.	81±0,12	68±0,39	50±0,18	50±0,08	50±0,10
	Ma io	93±0,53	22±0,27	n.t.	81±0,41	n.t.	93±0,75	n.t.	60±0,46	56±0,18



Apesar da *D. magna* não ter apresentado sensibilidade aquando da exposição aguda às amostras da albufeira, no ensaio de exposição crónica as amostras de água da albufeira induziram o decréscimo da produção de juvenis viáveis por *Daphnia*. A sobrevivência das mães foi de 100% para todas as amostras testadas. A frequência de mudança de carapaça foi observada diariamente e não se registaram diferenças significativas entre as várias concentrações testadas de cada amostra, durante os 21 dias de exposição. A diminuição da reprodução foi mais evidente no período seco. Neste período todas as amostras promoveram uma diminuição do número de juvenis por *Daphnia*, comparativamente com o controlo ( $p < 0,05$ ) (Fig. II.5.). No entanto, no período húmido também foi observada uma diminuição significativa do número de juvenis em alguns locais de amostragem: Alcarrache ( $F_{4,95}=7,49$ ;  $p < 0,001$ ), Montante ( $F_{4,95}=3,99$ ;  $p=0,005$ ), Mourão ( $F_{4,95}=2,07$ ;  $p=0,05$ ), Lucefecit ( $F_{4,95}=3,30$ ;  $p=0,01$ ), Moinho das Barcas ( $F_{4,95}=2,63$ ;  $p=0,04$ ) e Álamos ( $F_{4,95}=2,85$ ;  $p < 0,02$ ).



**Figura II. 5.** Variação espacial e temporal do número de juvenis produzidos por *D. magna*, durante 21 dias de exposição as amostras de água ((25, 50, 75, 100% (v/v)). Os resultados são expressos pela (média ± desvio padrão, n=20). \* Indica uma diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnnett's*,  $p < 0,05$ ).

A correlação de *Spearman* (Tabela II.4) permitiu estabelecer coeficientes de associação entre os parâmetros químicos analisados e os efeitos tóxicos agudos e crónicos observados. A inibição da luminescência da bactéria *V. fischeri* está positivamente correlacionada com o aumento do fósforo total, do clorpirifos, do ferro e do arsénio. Estes parâmetros atingiram concentrações mais elevadas no período húmido, o que justifica a maior sensibilidade da bactéria para amostras desse período. A mortalidade do *T. platyurus* está positivamente correlacionada com o CBO<sub>5</sub>, os cloretos, a atrazina, a simazina, a terbutilazina e o endossulfão sulfato, parâmetros que atingiram maiores concentrações no período seco. O número de juvenis por *Daphnia*, no ensaio de reprodução está negativamente correlacionado com o pH, a temperatura, o CBO<sub>5</sub>, os cloretos, a atrazina, a simazina, a terbutilazina e o endossulfão sulfato.

No que respeita ao efeito observado na exposição crónica, verificou-se que a toxicidade das amostras de água do período seco provavelmente está relacionada com as quantidades de herbicidas e de endossulfão sulfato quantificados, bem como com outros tóxicos não identificados. Assim, e apesar de vários estudos concluírem que as concentrações ambientais de atrazina não são tóxicas (Huber *et al.*, 1993; Solomon *et al.*, 1996), em mistura este herbicida pode potenciar o efeito de outros compostos, nomeadamente de pesticidas (Belden e Lydy, 2000; Banks *et al.*, 2005; Key *et al.*, 2007). Segundo Pape-Lindstrom e Lydy (1997), a atrazina aumentou significativamente a toxicidade de vários insecticidas (clorpirifos, malatião) no *Chironomus tentans*. Outros autores avaliaram o efeito, conjugado da atrazina com o endossulfão e verificaram que ocorreu um aumento do efeito tóxico no sistema imunitário de rãs (Christin *et al.*, 2004). Para além dos factos atrás mencionados a atrazina foi detectada na água da albufeira em concentrações superiores aos PQA propostos pela Comunidade Europeia.

No que respeita ao efeito observado no período húmido, este ocorreu principalmente em amostras de águas provenientes de áreas com intensa actividade agrícola e afluentes à albufeira onde os quantitativos de clorpirifos e endossulfão sulfato foram mais elevados. Apesar de não se ter verificado uma correlação entre o número de juvenis viáveis e o clorpirifos, os quantitativos encontrados na albufeira neste período, e os ensaios realizados em laboratório no presente estudo, sugerem o seu efeito no processo de reprodução.

Estes resultados estão em concordância com os efeitos observados nos ensaios crónicos laboratoriais, realizados com os pesticidas isolados, onde se observaram efeitos tóxicos como o decréscimo da taxa de reprodução e o aumento de anomalias embrionárias aquando da exposição do crustáceo *D. magna* a estes insecticidas (Zalisniak e Nugogoda, 2006; ver capítulo V, VI). Para o clorpirifos estes efeitos tóxicos ocorrem em concentrações ambientais. Considerando os valores de PQA para este insecticida, o valor de MA ( $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ), é superior às concentrações que promovem embriotoxicidade nos estudos laboratoriais (ver capítulo V). Pelo contrário, e no que respeita ao endossulfão sulfato, as suas concentrações na água da albufeira encontram-se entre  $0,01$  e  $1,80 \mu\text{g L}^{-1}$ , ou seja, valores cinco vezes mais baixos do que as concentrações que promoveram efeito tóxico crónico. Apesar de os resultados poderem indicar que o endossulfão sulfato não apresenta qualquer risco ecológico na albufeira, devemos ter presente que o seu elevado factor de bioconcentração (DeLorenzo *et al.*, 2002) em conjunto com a sua presença em misturas podem promover um aumento do seu impacto ambiental para as espécies do ecossistema aquático em estudo.

**Tabela II.4.** Coeficientes de correlação de *Spearman R* entre os parâmetros analíticos e os efeitos ecotoxicológicos obtidos nas amostras de água (n=20).

	<b>Inibição da bioluminescência do <i>V. fisheri</i></b>	<b>Mortalidade do <i>T.</i> <i>platyurus</i></b>	<b>Número de juvenis/<i>D. magna</i></b>
<b>pH</b>	-0,06	0,47*	- 0,57*
<b>Temperatura</b>	0,01	0,41	- 0,67*
<b>CBO<sub>5</sub></b>	0,42	0,55*	- 0,46*
<b>Fósforo Total</b>	0,62*	0,11	0,22
<b>Nitrato</b>	0,38	-0,05	0,31
<b>Cloretos</b>	0,30	0,63*	-0,75*
<b>Atrazina</b>	0,21	0,55*	-0,78*
<b>Simazina</b>	0,31	0,56*	-0,62*
<b>Terbutilazina</b>	0,29	0,54*	-0,63*
<b>Clorpirifos</b>	0,51*	-0,07	0,06
<b>Endossulfão sulfato</b>	-0,15	0,44*	-0,63*
<b>Ferro</b>	0,49*	0,20	0,18
<b>Mangânes</b>	0,33	0,30	0,10
<b>Arsénio</b>	0,53*	0,04	0,11

\* Correlações significativas para um  $p < 0,05$

## II.4. Conclusões

Este estudo mostrou que um número considerável de amostras provenientes de diferentes locais da albufeira continha potenciais poluentes tóxicos. Os locais com maior potencial tóxico localizaram-se a montante da albufeira (Sra. Ajuda) e na albufeira em áreas de intensa actividade agrícola (Álamos). Parâmetros químicos específicos e substâncias perigosas (pesticidas) confirmam a presença de toxicidade na água que induz uma resposta tóxica positiva nos bioindicadores.

A toxicidade aguda observada não apresentou um perfil linear podendo ser resultante de descargas pontuais e isoladas para o meio receptor. No entanto, neste estudo obteve-se correlações positivas entre alguns parâmetros quantificados na albufeira, e os bioindicadores utilizados. Por outro lado, alguns desses parâmetros encontram-se abaixo dos limites impostos pela legislação, como os cloretos, simazina e a terbutilazina.

A partir dos resultados é, ainda, possível retirar que as espécies *V. fisheri* e *T. platyurus* são duas das espécies que devem integrar futuros programas de avaliação ecotoxicológica aguda da albufeira

A toxicidade crónica pode ser consequência do efeito integrado de herbicidas, insecticidas e matéria orgânica, para além de outros tóxicos não identificados. Estes poluentes são originários principalmente das actividades agrícolas e das descargas de efluentes industriais.

As respostas aos ensaios crónicos mostraram que especialmente no período seco, algumas das espécies de crustáceos pertencentes ao ecossistema aquático em estudo podem estar em risco. Assim, para reduzir o impacto negativo resultante da contaminação actual da massa de água é necessário a implementação de processos que conduzam à eliminação de substâncias perigosas nas afluências à albufeira.

### **CAPÍTULO III**

#### **AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DOS PESTICIDAS PRIORITÁRIOS E REPRESENTATIVOS DA ALBUFEIRA DO ALQUEVA**



### **Resumo**

As águas superficiais localizadas em áreas de intensiva actividade agrícola são mais vulneráveis à contaminação por pesticidas, que é um grave problema de saúde pública principalmente se essa água for usada para abastecimento às populações. O objectivo deste estudo foi avaliar a presença e a distribuição dos pesticidas mais usados na área envolvente da albufeira do Alqueva. Para a análise do risco ambiental dos pesticidas usamos os padrões de qualidade ambiental propostos recentemente pela Comissão Europeia. Os pesticidas analisados pertencem às classes de fenilureias, triazinas, cloroacetanilidas e organofosforados e, foram identificados e quantificados por extracção em fase sólida "on-line" seguida de cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massas "tandem". Os pesticidas mais frequentemente detectados foram atrazina, simazina, diurão e terbutilazina. Os níveis mais elevados destes pesticidas foram registados na Primavera, após aplicação daqueles nos campos agrícolas nomeadamente, no olival e na vinha. Os pesticidas prioritários atrazina e diurão atingiram valores acima da média anual proposta pela Comissão Europeia. Por outro lado, a atrazina atingiu valores que ultrapassaram a concentração média anual proposta. As estações de amostragem mais afectadas por estes pesticidas foram Sra. Ajuda, Lucefecit e Alcarrache, todas localizadas no troço a montante da albufeira.

### III.1. Introdução

O uso extensivo de pesticidas na agricultura e a adicional poluição ambiental causada pela emissão industrial durante a sua produção teve como resultado o aumento dos quantitativos destes e dos seus metabolitos nos alimentos, água e solo (Kampioti *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, a preocupação com a contaminação dos recursos hídricos cresceu devido ao aumento do número de pesticidas detectados nas águas. A contaminação da água pode acarretar efeitos ecotoxicológicos para a fauna e flora do ecossistema aquático e para a saúde das populações se for utilizada para consumo humano (Jorgenson, 2001; Pellacani *et al.*, 2006). Assim, é necessária legislação, cada vez mais restrita, para a protecção das massas de água de modo a limitar quer os riscos para a saúde das populações quer o risco ambiental (Quintana *et al.*, 2001).

As águas superficiais e subterrâneas são contaminadas directa e indirectamente, por pesticidas, através da actividade industrial, descargas de efluentes, deposição atmosférica e lixiviação dos solos (Rodrigues-Moraz *et al.*, 2006).

A contaminação das águas superficiais por pesticidas na região do Alentejo é a principal fonte de poluição difusa da Bacia Hidrográfica do Guadiana (Dias *et al.*, 2004). Este é o primeiro estudo na albufeira do Alqueva que avalia quais os pesticidas mais representativos na sua massa de água. No entanto, este tipo de estudo é imprescindível, quer para a avaliação do risco ambiental tanto para o ecossistema como para as populações, quer para evidenciar a necessidade de alterações das práticas agrícolas de modo a melhorar a qualidade dos recursos hídricos.

No presente estudo, foram avaliados 14 pesticidas, que pertencem às classes de fenilureias, triazinas, cloroacetanilidas e organofosforados, tiocarbamatos e dois produtos da transformação das triazinas, a desetilatrazina (DEA) e desisopropilatrazina (DIA). Cinco destes pesticidas nomeadamente, alacloro, atrazina, diurão, isoproturão e simazina estão incluídos na lista de substâncias prioritárias da Directiva Quadro da Água (ECC, 2000). Os padrões de qualidade ambiental (PQA) propostos para estes pesticidas estão descritos na Tabela 1.

Considerando os factos atrás mencionados, o objectivo deste estudo foi a avaliação da dinâmica de pesticidas aplicados nos campos agrícolas da região do Alentejo, na água da albufeira do Alqueva para posterior análise do seu risco ambiental.

### **III. 2. Material e Métodos**

#### **III.2.1. Área de Estudo**

A área de estudo e os locais de amostragem foram descritos na secção material e métodos do capítulo I.

As amostras de água foram recolhidas durante 2006-2007, nas nove estações de amostragem seleccionadas ao longo da albufeira. As amostras (250 mL) foram recolhidas a uma profundidade de 50 cm e armazenadas em garrafas de cor âmbar a 4 °C até ao laboratório e depois congeladas a -18 °C até à sua análise. Foram realizadas dez campanhas, entre Junho de 2006 e Junho de 2007, com excepção dos meses de Agosto e Setembro de 2006 e Abril de 2007. Assim, as amostras foram recolhidas nos meses de Junho (J06), Julho (J106), Outubro (O06), Novembro (N06) e Dezembro (D06) de 2006 e Janeiro (J07), Fevereiro (F07), Março (Mr07), Maio (M07) e Junho (J07) de 2007.

### III.2.2. Químicos

Foram adquiridos os padrões de pesticidas de elevada pureza (98-99%) à Sigma<sup>®</sup> (St. Luís, Mo, USA). Foram preparadas as soluções padrão de cada composto em metanol (1 mg mL<sup>-1</sup>) e guardadas no escuro a 4 °C. As soluções padrões das misturas de todos os compostos com concentrações entre 1 ng mL<sup>-1</sup> e 10 µg mL<sup>-1</sup> foram preparadas em solução de metanol, na diluição apropriada. Foram utilizadas misturas padrão para a preparação dos padrões de calibração, que não apresentam mais de 0,1% de metanol. A água ultra-pura para HPLC, o acetonitrilo e o metanol foram fornecidos pela Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha).

### III.2.3. Procedimento analítico

A quantificação deste grupo de pesticidas foi realizada com base na técnica analítica de extracção em fase sólida *on-line* seguida de cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massas *tandem* (SPE-LC-MS/MS), seguindo o protocolo descrito por Kampioti *et al.* (2005).

Na tabela III.1. estão descritas as condições de ensaio, bem como os limites de quantificação e detecção para cada um dos pesticidas analisados.

**Tabela III.1.** Parâmetros de performance do método: tempo de retenção ( $t_R$ ), limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e coeficientes de correlação linear ( $r^2$ ).

Composto	$t_R$ (min)	ISR transição (m/z)*		LD (ng L <sup>-1</sup> )	LQ (ng L <sup>-1</sup> )	$r^2$
<b>DIA</b>	9,36	174	104; 132	0,32	0,84	0,999
<b>DEA</b>	11,13	188	146; 104	0,06	0,17	0,995
<b>Dimetoato</b>	11,41	230	199; 125	0,10	0,27	0,997
<b>Simazina</b>	13,18	202	132; 124	0,14	0,37	0,997
<b>Isoproturão</b>	13,20	213	72; 140	0,33	0,89	0,995
<b>Clortolurão</b>	14,22	207	72; 165	0,12	0,12	0,998
<b>Atrazina</b>	14,66	216	174; 132	0,09	0,23	0,999
<b>Diurão</b>	14,77	241	214; 174	0,19	0,50	0,999
<b>Cianazina</b>	14,98	233	72; 235    72	0,20	0,54	0,998
<b>Molinato</b>	17,30	188	126; 83	1,02	2,73	1,000
<b>Terbutilazina</b>	17,76	230	174; 132	0,35	0,93	1,000
<b>Linurão</b>	19,17	249	160; 182	0,49	1,30	0,999
<b>Alacloro</b>	19,97	270	238; 162	2,73	7,28	0,995
<b>Metolacloro</b>	20,07	284	252; 176	0,22	0,60	0,999
<b>Malatião</b>	20,27	353	195; 227	0,38	1,01	1,000
<b>Diazinão</b>	23,71	305	169; 153	0,04	0,11	0,999

\*precursor ♦ producto iónico; producto ionico da confirmação transaccional.

#### III.2.4. Análise Estatística.

Os resultados analíticos obtidos foram analisados por técnicas de estatística de análise multivariada, nomeadamente análise de componentes principais (ACP) e análise de factores (AF). Para a interpretação dos resultados utilizou-se o critério de Kaiser (Kaiser, 1960). Os valores próprios das variáveis originais são agrupados segundo a classificação proposta por Liu *et al.* (2003). As vantagens da aplicação da análise multivariada foram abordadas no capítulo I. Os parâmetros analíticos foram determinados em triplicado e, os valores médios foram utilizados para a subsequente análise de dados.

### III.3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para os pesticidas analisados, no período de estudo, mostram que os níveis mais elevados destes compostos foram detectados nos meses de Maio, Junho e Julho, o que é coincidente com a sua aplicação nos campos agrícolas, resultados similares foram descritos por outros autores (Quintana *et al.*, 2001; Cerejeira *et al.*, 2003; Carabias-Martinez *et al.*, 2003). Os compostos mais detectados foram a atrazina, simazina, diurão e a terbutilazina (Fig. III.1). É evidente, pela análise da figura, que a atrazina foi o pesticida que apresentou as concentrações mais elevadas na água da albufeira, especialmente nos meses quentes. A maior concentração de atrazina foi detectada em Alcarrache ( $5\,504,55\text{ ng L}^{-1}$ ). Outros locais de amostragem que apresentaram valores consideráveis deste pesticida foram Sra. Ajuda ( $1\,375,95\text{ ng L}^{-1}$ ), Lucefecit ( $1\,146,38\text{ ng L}^{-1}$ ) e Mourão ( $552,47\text{ ng L}^{-1}$ ). As concentrações mais baixas deste pesticida foram quantificadas em Ardila. As concentrações máximas da simazina e da terbutilazina foram observadas em Maio de 2007, em Sra. Ajuda, com valores de  $112,42\text{ ng L}^{-1}$  e  $662,03\text{ ng L}^{-1}$ , respectivamente. Os níveis de triazinas quantificados neste estudo foram similares aos valores observados por outros autores em estudos no Sul da Europa (Aguilar *et al.*, 1999; Almeida Azevedo *et al.*, 2000; Lacorte *et al.*, 2001; Cerejeira *et al.*, 2003; Rodrigues-Moraz *et al.*, 2004; Tauler *et al.*, 2004). O maior pico de diurão ocorreu entre Novembro e Dezembro de 2007, na Sra. Ajuda.

Considerando o valor limite estabelecido na Directiva 98/83/CE (ECC, 1998a), para a qualidade da água para consumo humano, todos estes pesticidas foram detectados em concentrações superiores ao seu máximo admissível ( $0,1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ). Os PQA propostos pela Comissão Europeia (ECC, 2007) têm em consideração o perfil toxicológico dos pesticidas prioritários. Usando os PQA, as concentrações de atrazina ultrapassaram a CMA em Alcarrache e, a MA em Sra. Ajuda, Alcarrache e Lucefecit, regiões localizadas a montante da albufeira. Os níveis de diurão ultrapassaram os PQA em Sra. Ajuda e Lucefecit. Os restantes pesticidas foram detectados em concentrações abaixo de  $15\text{ ng L}^{-1}$  (malatião, metolacloro, molinato, linurão, clortolurão e DIA) e  $5\text{ ng L}^{-1}$  (diazinão, alacloro, isoproturão, cianazina, dimetoato).

No entanto, foram observados níveis pontualmente elevados de clortolurão, metolacloro, diazinão, alacloro e linurão (Tabela III.2).

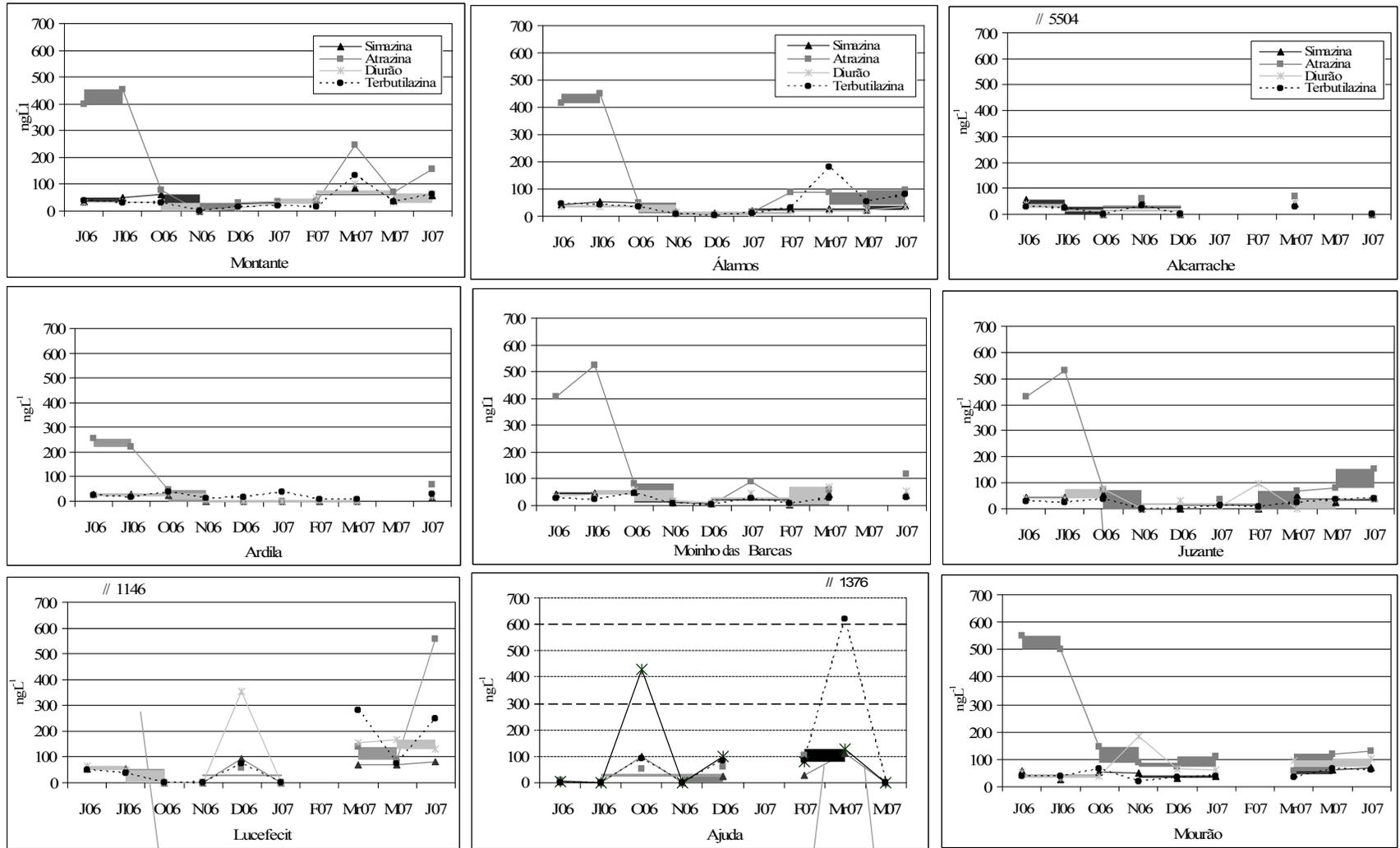
A avaliação espacial mostrou que o norte da albufeira está mais poluído por pesticidas, evidenciando um impacto negativo da intensa actividade agrícola proveniente de Espanha e das regiões circundantes à albufeira. Sra. Ajuda e Lucefecit apresentam, no geral, os níveis mais elevados de pesticidas. Mourão apresenta um perfil idêntico, no que respeita ao tipo de pesticida, embora as concentrações detectadas sejam muito mais baixas. A menor concentração de pesticidas foi observada em Moinho das Barcas e Ardila.

**Tabela III.2.** Valores médios (ng L<sup>-1</sup>), limites e percentagem de detecção dos pesticidas determinados nas amostras de água, da albufeira do Alqueva, durante o estudo (n=81).

		Álamos	Alcarrache	Mourão	Montante	Juzante	Luçefêcit	M. Barcas	Sra. Ajuda	Ardila
DIA	Média	3,79	4,47	5,44	5,85	3,31	3,42	3,44	2,07	1,51
	Limites	1,30-6,43	< LD -10,36	2,77-7,92	< LD-10,92	< LD-6,55	< LD-8,23	< LD-7,91	< LD-13,47	< LD-4,13
	% Detecção	100%	50%	100%	90%	70%	67%	89%	25%	44%
DEA	Média	5,95	7,91	5,44	5,85	3,31	3,42	3,44	5,83	1,51
	Limites	1,70-11,05	< LD -26,97	2,77-7,92	< LD-10,92	< LD-6,55	< LD-8,23	< LD-7,91	< LD-25,75	< LD-4,13
	% Detecção	100%	50%	100%	90%	80%	67%	100%	62,5%	56%
Dimetoato	Média	0,17	0,55	0,53	0,05	0,23	0,45	0,25	2,23	2,80
	Limites	< LD -1,40	< LD -3,13	< LD-2,61	< LD-0,21	< LD-1,93	< LD-2,46	< LD-0,99	< LD-16,30	< LD-23,79
	% Detecção	10%	10%	33%	10%	20%	22%	33%	25%	22%
Simazina	Média	31,07	25,38	47,91	43,48	28,97	47,11	31,21	32,80	11,89
	Limites	10,10-54,08	< LD -56,26	27,48-68,78	< LD-85,85	< LD-54,39	< LD-95,15	2,07-50,65	< LD-112,42	0,57-30,90
	% Detecção	100%	50%	100%	90%	80%	67%	100%	63%	100%
Isoproturão	Média	3,79	0,96	5,44	5,85	3,31	3,42	3,44	2,07	1,51
	Limites	1,30-6,43	< LD -4,20	2,77-7,92	< LD-10,92	< LD-6,55	< LD-8,23	< LD-7,91	< LD-13,47	< LD-4,13
	% Detecção	100%	50%	100%	90%	70%	67%	89%	25%	44%
Clorotolurão	Média	11,4	3,19	8,41	6,35	5,67	13,1	5,91	14,6	1,76
	Limites	3,86-30,35	< LD-9,11	0,13-2,27	< LD-16,99	< LD-13,27	< LD-26,35	< LD-10,02	< LD-43,57	< LD-4,80
	% Detecção	100%	50%	89%	90%	70%	67%	90%	63%	56%
Atrazina	Média	126,16	1084,94	196,94	150,46	137,39	325,52	144,66	199,86	66,28
	Limites	4,62-451,09	< LD-5504,55	55,52-552,47	< LD-451,69	< LD-530,95	< LD-1146,38	3,24-525,71	< LD-1375,95	< LD-255,17
	% Detecção	100%	50%	100%	90%	80%	67%	100%	63%	90%
Diurão	Média	24,24	20,06	78,57	38,23	36,26	102,20	38,97	92,94	13,79
	Limites	9,20-41,36	< LD-43,74	29,06-184,48	< LD-101,12	< LD-95,58	< LD-354,05	6,75-69,73	< LD-428,17	1,46-35,93
	% Detecção	100%	50%	100%	90%	80%	78%	100%	75%	100%
Cianazina	Média	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,40	< LD	< LD
	Limites							< LD -2,71		
	% Detecção							11%		

**Tabela III.2. (continuação)**

		Alamos	Alcarrache	Mourão	Montante	Juzante	Luçefécit	M. Barcas	Sra. Ajuda	Ardila
Molinato	Média	< LD	0,76	0,26	1,34	< LD	2,62	0,50	4,71	< LD
	Limites	< LD -4,34	< LD -4,34	< LD -1,04	< LD -12,00		< LD -15,36	< LD -3,22	< LD -13,21	
	% Detecção		14%	11%	10%		44%	11%	50%	
TBA	Média	48,56	15,95	43,36	38,52	21,03	84,51	22,42	110,04	21,47
	Limites	2,47-180,21	< LD-31,29	18,41-66,38	< LD-134,85	< LD-42,00	< LD-279,22	5,07-46,18	< LD-622,03	7,73-39,60
	% Detecção	100%	50%	100%	90%	80%	67%	100%	63%	100%
Linurão	Média	2,50	0,33	1,24	0,83	0,60	1,63	0,91	1,16	0,41
	Limites	< LD-10,75	< LD-1,34	0,19-2,98	< LD-1,73	< LD-1,37	< LD-4,43	< LD -3,29	< LD-8,45	< LD-1,26
	% Detecção	90%	17%	100%	90%	60%	56%	67%	13%	33%
Alacloro	Média	0,18	34,35	0,54	< LD	0,16	23,26	0,38	16,18	0,28
	Limites	< LD-0,58	< LD-239,65	< LD-1,71		< LD-0,48	< LD-102,70	< LD-2,41	< LD-119,08	< LD-1,49
	% Detecção	10%	17%	44%		10%	56%	11%	38%	11%
Metolacloro	Média	2,09	9,92	5,12	3,26	6,78	16,25	7,04	39,04	2,52
	Limites	< LD-5,27	< LD-59,73	3,28-7,15	< LD-9,91	< LD-47,46	< LD-52,46	< LD-40,81	< LD-278,30	< LD-8,43
	% Detecção	80%	50%	100%	90%	70%	67%	78%	38%	44%
Malatião	Média	1,61	1,39	1,69	1,93	3,05	3,34	2,28	2,39	1,23
	Limites	< LD- 4,50	< LD-4,26	< LD-7,90	< LD-11,07	< LD-15,59	< LD-9,62	< LD-13,27	< LD-12,76	< LD-3,75
	% Detecção	20%	17%	11%	10%	10%	44%	11%	13%	11%
Diazinão	Média	0,71	1,87	1,22	0,68	0,82	4,13	2,32	9,47	1,64
	Limites	0,26-1,11	0,13-8,38	0,69-2,70	< LD-2,68	< LD-1,77	0,52-10,95	0,55-12,05	0,18-60,04	0,44-5,18
	% Detecção	100%	100%	100%	90%	90%	100%	100%	100%	100%



**Figura III.1.** Variação sazonal dos pesticidas ( $\text{ng L}^{-1}$ ) atrazina, simazina, terbutilazina e diurão, determinados nas amostras de água da albufeira do Alqueva, no estudo.

A correlação de *Pearson* mostrou associações fortemente positivas ( $p < 0,0001$ ) entre vários pesticidas: simazina e DIA ( $r=0,76$ ), simazina e DEA ( $r=0,74$ ), terbutilazina e metoalaclo (r=0,86), metoalaclo e diazinão ( $r=0,94$ ), clortolurão e diurão ( $r=0,73$ ), isoproturão e clortolurão ( $r=0,78$ ) e diurão e simazina ( $r=0,69$ ). O DIA, como um dos produtos de transformação da simazina, tal como se previa, está positivamente correlacionado com a simazina. A correlação entre DEA (principal produto da transformação da atrazina e da terbutilazina) e a simazina resulta provavelmente da aplicação combinada da simazina com a atrazina e/ou terbutilazina. A não correlação da atrazina e dos seus principais produtos de transformação pode ser devida às concentrações muito elevadas de atrazina comparativamente com as dos outros compostos. A maioria das restantes correlações pode ser explicadas pela aplicação conjunta dos pesticidas nos campos agrícolas.

O ACP/AF permitiu a obtenção de cinco CPs com coeficientes de correlação (atributos) superior a um, e que explicam 77% da variância total dos dados originais. A rotação *varimax* foi realizada nos três primeiros CPs, pois foram os que apresentam fontes de variância significativas com valor próprio superior a 0,5. O primeiro varifactor (VF1) explica 36% da variância total e está fortemente correlacionado com o DEA, a terbutilazina, metoalaclo e o diazinão e moderadamente correlacionado com a atrazina, DIA, dimetoato, simazina, molinato, linurão e alaclo. O VF2 explica 16% da variância total e está fortemente correlacionado com o diurão, isoproturão, clortolurão e moderadamente correlacionado com a simazina. O VF3 explica 10% da variância total e está fortemente correlacionado com a cianazina e o malatião (Tabela III.3). O VF1 e o VF2 são maioritariamente explicados pelos pesticidas que atingem maiores concentrações na albufeira.

**Tabela III.3.** Coeficientes de correlação dos 16 pesticidas nos três VF obtidos no estudo (n=81).

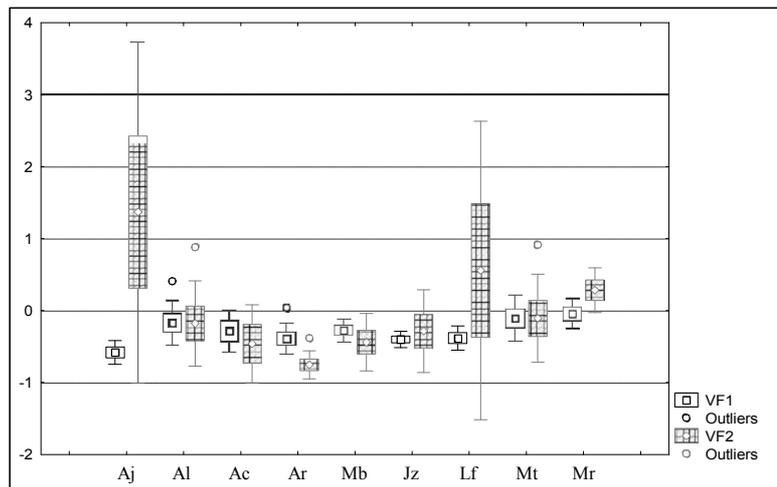
	VF1	VF2	VF3
DIA	0,565*	0,255	0,478*
DEA	0,737**	0,256	0,250
Dimetoato	0,576*	-0,098	-0,083
Simazina	0,525*	0,686*	0,246
Isoproturão	-0,072	0,859**	-0,051
Clortolurão	0,089	0,930**	0,027
Atrazina	0,451*	-0,043	-0,129
Diurão	0,163	0,851**	-0,021
Cianazina	0,055	-0,047	0,718**
Molinato	0,509*	0,166	-0,379
TBA	0,781**	0,362	0,086
Linurão	0,574*	0,265	0,176
Alacloro	0,699*	-0,096	-0,199
Metolacloro	0,925**	0,042	-0,073
Malatião	-0,028	0,052	0,728**
Diazinão	0,878**	0,067	0,047
<b>Valor Próprio</b>	5,030	3,190	1,653
<b>Variância (%)</b>	36,06	15,85	9,80
<b>Variância Acumulada (%)</b>	36,06	51,90	61,71

(\*) Parâmetros moderadamente correlacionados com o VF;

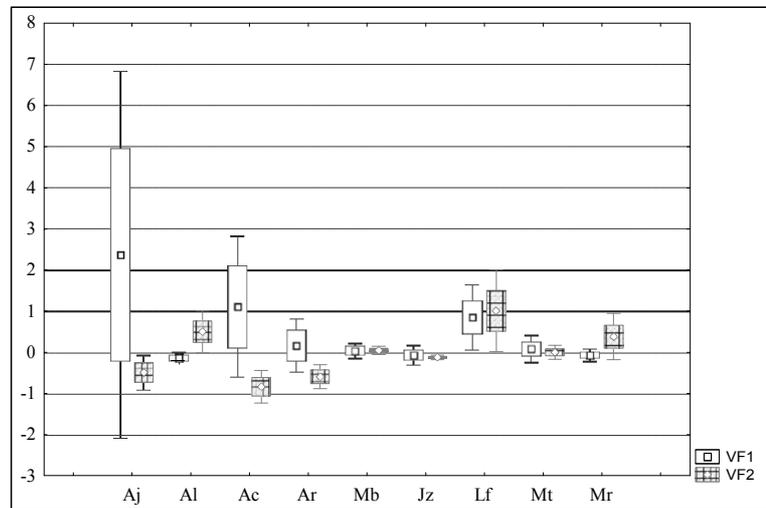
(\*\*) Parâmetros fortemente correlacionados com o VF.

Recorreu-se a gráficos do tipo *Box-and-Wisker* para a representação da projecção das amostras nos dois eixos principais (VF1 e VF2), com o objectivo de identificar quais os locais que sofreram maior influência dos pesticidas que descrevem cada VF. Foram utilizados dois critérios de diferenciação: variação temporal (período seco e período húmido) e estação de amostragem (Fig. III.2.). A água em todas as estações de amostragem encontrava-se mais contaminadas no período seco. No período húmido a albufeira foi mais influenciada pelos pesticidas que descrevem o VF2, sendo os locais mais influenciados Sra. Ajuda, Lucefecit e Álamos. Os locais mais influenciados pelos pesticidas que descrevem o VF1 foram Sra. Ajuda, Alcarrache, Lucefecit e Álamos, especialmente no período seco.

Assim, Sra. Ajuda, Lucefecit e Álamos foram os locais mais influenciados por pesticidas nos dois períodos. Locais que, como se tem visto pelos estudos anteriores, são influenciados pela contaminação proveniente de Espanha e pela intensa actividade agrícola na envolvente da albufeira.



(a)



(b)

**Figura III.2.** Representação gráfica do tipo *Box-and-Wisker* referente à projecção das amostras nos dois principais varifactores **(a)** VF1 (fortemente correlacionado com DEA, TBA, metolacloro, diazinão) e VF2 (fortemente correlacionado com o diurão, isoproturão e clorotulorão) no período húmido; **(b)** VF1 e VF2, no período seco.

### III.4. Conclusão

Os resultados indicam que há uma forte correlação entre a poluição da água da albufeira e as práticas agrícolas nas áreas circundantes. As principais classes de pesticidas detectados na albufeira foram as triazinas e as fenilureias, nomeadamente, atrazina, simazina, terbutilazina e diurão. Estes herbicidas mostraram um perfil sazonal distinto e relacionado com a sua aplicação nos campos. Este facto pode indicar que a poluição da água não é persistente e que a degradação destes pesticidas na água pode ser rápida. Pelo contrário, alguns pesticidas como o diazinão, metolaclo e o linurão, foram detectados em concentrações baixas mas durante longos períodos de tempo, o que pode indicar que estes pesticidas persistem na massa de água e podem constituir um potencial risco para o ecossistema aquático em estudo.

Alguns pesticidas como a cianazina, o malatião, o molinato e o dimetoato, não foram detectados na albufeira, ou apresentaram uma percentagem de detecção muito baixa.

A análise temporal mostrou que no período húmido, os pesticidas que influenciaram a variabilidade da qualidade da água da albufeira foram o diurão, o isoproturão e o clortolurão. No período seco, os pesticidas que mais influenciaram a qualidade da água da albufeira foram a terbutilazina, atrazina e a simazina. A avaliação espacial mostrou que a região norte da albufeira é a mais poluída por pesticidas

Este estudo permitiu a identificação de alguns dos mais relevantes pesticidas detectados na água da albufeira do Alqueva, que devem ser tidos em consideração em futuros programas de avaliação de risco ambiental na área.

Neste estudo, os PQA, permitiram identificar pesticidas com um potencial risco agudo e/ou crónico para as espécies do ecossistema aquático em estudo em períodos de tempo específicos. Assim, a atrazina ultrapassou os limites propostos para a protecção contra exposições agudas e crónicas e o diurão ultrapassou os limites para a protecção contra a exposição crónica.

**PARTE B**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DAS  
PROPRIEDADES ENDÓCRINAS DE PESTICIDAS  
QUANTIFICADOS NA ALBUFEIRA DO ALQUEVA**



## **CARACTERÍSTICAS DE PESTICIDAS IDENTIFICADOS NO SISTEMA EM ESTUDO: ATRAZINA, ENDOSSULFÃO SULFATO E CLORPIRIFOS**

A monitorização dos pesticidas não deve basear-se somente na identificação e quantificação dos níveis destes compostos nas águas mas deve ser complementada através de ensaios biológicos, uma vez que estes compostos apresentam efeitos agudos e crónicos muito acentuados (Hernando *et al.*, 2007). Os efeitos adversos agudos de alguns produtos fitossanitários devem-se principalmente à sua elevada toxicidade intrínseca. Os efeitos crónicos incluem os devidos às suas características de bioacumulação e persistência ambiental, como a carcinogenicidade, a mutagenicidade, a genotoxicidade, alterações no sistema imunitário e endócrino dos mamíferos, peixes e aves (IPCS, 2002). Mesmo em concentrações baixas os pesticidas apresentam riscos significativos quer para espécies aquáticas, quer para o homem (Rodrigues-Moraz *et al.*, 2004).

A utilização dos bioensaios permite a determinação de efeitos e quantidades tóxicas para os organismos e a avaliação integrada desses efeitos nas populações e nas comunidades do ecossistema aquático, bem como estabelecer margens e limites de segurança (Ohe *et al.*, 2004). A avaliação da toxicidade aguda e crónica dos pesticidas no ecossistema aquático é uma etapa imprescindível na avaliação de risco ambiental e possibilita a obtenção de evidências para a implementação de programas de utilização sustentável destes compostos (Moore *et al.*, 1998).

A selecção dos pesticidas que integraram a avaliação de risco ecotoxicológico na segunda parte do trabalho de investigação, baseou-se na frequência de aplicação nas culturas do Alentejo, nomeadamente, cereais, tomate, vinha e olival, na frequência de detecção na albufeira de Alqueva e na relevância ambiental. Os três pesticidas seleccionados integram, ainda, a lista das substâncias prioritárias da Directiva de 2000/60/CE (ECC, 2000).

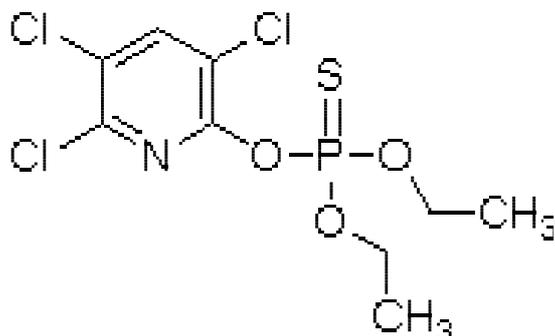
## CLORPIRIFOS

O esforço em substituir os pesticidas organoclorados por grupos de menor persistência ambiental aumentou a utilização de pesticidas organofosforados. No entanto, este grupo de pesticidas é muito mais tóxico para os vertebrados. Apesar da sua rápida degradação ambiental, apresentam uma toxicidade aguda, para o homem e para os mamíferos, muito acentuada (Chambers *et al.*, 2001).

Na Tabela 2 estão descritas as propriedades físico-químicas do insecticida organofosforado clorpirifos e, na Figura 7 está representada a estrutura química do composto.

**Tabela 2.** Propriedades químicas do clorpirifos (Racke, 1993; Moore *et al.*, 1998).

	<b>Clorpirifos</b>
<b>Peso molecular (gmol<sup>-1</sup>)</b>	350,62
<b>Ponto de Fusão (°C)</b>	41,5-44
<b>Solubilidade em água, 25°C (mgL<sup>-1</sup>)</b>	2
<b>Pressão de Vapor, 25°C (mm Hg)</b>	1,87E <sup>-03</sup>
<b>Coefficiente de Partilha</b>	4,69
<b>Coefficiente de Partilha octanol/água (K<sub>ow</sub>)</b>	66 000
<b>Tempo Semi-vida (água) (dias)</b>	29-74
<b>Tempo Semi-vida (solo) (dias)</b>	60-120



**Figura 7.** Estrutura química do Clorpirifos (adaptado de Moore *et al.*, 1998).

No que respeita ao percurso ambiental no ecossistema aquático, a bioconcentração e persistência, deste insecticida na água, varia de acordo com o tipo de formulação (aumenta em formulações com agentes emulsificadores ou sob a forma de grânulos de libertação controlada) (USEPA, 1986; EXTOXNET, 1996a). Este insecticida é instável na água e a taxa de hidrólise aumenta com a temperatura. Para além disso, a taxa de hidrólise é constante em águas ácidas e neutras mas, aumenta nas águas alcalinas. Em águas com um pH=7,0 e uma temperatura de 25 °C o pesticida apresenta um tempo de semi-vida de 35 a 78 dias (Howard, 1991). Por outro lado, como adere aos sedimentos e à matéria orgânica as suas concentrações na água rapidamente diminuem. A volatilização é provavelmente a principal rota de eliminação do insecticida da água sendo o tempo de semi-vida estimado para este processo de 3,5 a 20 dias (Racke, 1992).

No que respeita à toxicocinética este insecticida é rapidamente absorvido para a corrente sanguínea quando ingerido, inalado ou após exposição cutânea. Nos humanos, o clorpirifos e o seu principal metabolito são rapidamente eliminados (Gallo e Lawryk, 1991), pois após uma única dose oral o tempo de semi-vida na corrente sanguínea é de um dia (NIOSH, 1981). No rato, após ingestão, 90% do clorpirifos é eliminado pela urina e 10% pelas fezes (RSCIS, 1991). É rapidamente destoxificado nos ratos, cães e outros mamíferos (USPHS, 1995).

O metabolito que se encontra em maior quantidade na urina dos ratos é o tricloropiridinol, que não inibe a colinesterase, nem é mutagénico (USPHS, 1995). Por outro lado, este insecticida não apresenta um potencial de bioacumulação elevado (Gallo e Lawryk, 1991).

Este grupo de insecticidas actua a nível do sistema nervoso central, mais especificamente, inibindo a acetilcolinoesterase com a consequente acumulação de acetilcolina nas sinapses (Klaassen, 2001).

A toxicidade aguda em mamíferos apresenta valores de  $LC_{50}$ , para uma exposição oral de 95 a 270  $mg\ Kg^{-1}$  em ratos, de 60  $mg\ Kg^{-1}$  em murganhos, de 1000  $mg\ Kg^{-1}$  em coelhos, de 32  $mg\ Kg^{-1}$  em galinhas; de 500  $mg\ Kg^{-1}$  em porcos da Índia, e de 800  $mg\ Kg^{-1}$  em ovelhas (Gosselin *et al.*, 1984; Gallo e Lawryk, 1991; RSCIS, 1991).

Em estudos crónicos, com ratos e murganhos expostos durante 104 dias a 3  $mg\ Kg^{-1}\ dia^{-1}$  de clorpirifos observou-se, somente efeitos adversos correspondentes à inibição da enzima colinesterase, com a reposição dos níveis de colinesterase após a interrupção da exposição (USEPA, 1989). Em estudos de reprodução com ratos não se observou qualquer efeito com doses de 1,0 e 1,2  $mg\ Kg^{-1}\ dia^{-1}$  (USEPA, 1989; ACGIH, 1986; USPHS, 1995). Não há evidências de propriedades carcinogénicas ou mutagénicas deste insecticida (USEPA, 1989).

O clorpirifos é moderadamente tóxico para os humanos (USEPA, 1989). Envenenamentos podem afectar o sistema nervoso central, o sistema cardiovascular e o sistema respiratório. É um irritante para a pele e olhos. Estudos indicam que a absorção através da pele é limitada (Gallo e Lawryk, 1991). Os sinais e sintomas da exposição aguda são estado febril, falta de coordenação dos movimentos, tremores, dificuldade na fala, perda de memória, cansaço, instabilidade emocional, dificuldade de concentração, ansiedade, dificuldade respiratória, diminuição dos batimentos cardíacos. Elevadas doses podem resultar em inconsciência, incontinência e convulsões, podendo levar à morte (Gallo e Lawryk, 1991). Os níveis da actividade colinesterásica no plasma encontram-se diminuídos quando o insecticida é inalado (USPHS, 1995).

Um estudo em voluntários humanos expostos diariamente a  $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ , durante quatro semanas, mostrou alterações significativas de inibição dos níveis de colinesterase nos eritrócitos e no plasma (ACGIH, 1986).

A toxicidade promovida por este insecticida no ecossistema aquático é acentuada. Estudos de exposição crónica de *Photobacterium phoshorum*, ao clorpirifos, sugerem que as bactérias são das espécies mais resistentes a este insecticida apresentando valores de  $EC_{50}$  de  $46 \text{ g L}^{-1}$  (Somasundaram *et al.*, 1990).

No entanto, quando se avaliou a toxicidade do insecticida em algas de água doce verificou-se que as espécies *Chlorella vulgaris* e *Ankistrodemus falcatus* sofreram um decréscimo do crescimento para concentrações de 10 e  $100 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente (Brown e Chow, 1974). Outros investigadores também observaram a redução das taxas de crescimento de três algas expostas à formulação comercial Dursban 4E<sup>®</sup>, num meio rico em fósforo (van Donk *et al.*, 1992).

Estudos em invertebrados determinaram valores de 48h- $LC_{50}$  de  $0,19 \text{ g L}^{-1}$  (Kikuchi *et al.*, 2000) e inferiores a  $0,36 \text{ g L}^{-1}$  (Siefert, 1984) para *Daphnia magna*. Por outro lado, estudos com embriões de camarão (*Palaemonetes pugio*) nas últimas fases de desenvolvimento mostraram que esta fase do ciclo de vida é muito sensível ao clorpirifos, com valores de 24h- $EC_{50}$ , para os estádios de desenvolvimento 6 e 7 de 0,49 e  $0,36 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente (Lund *et al.*, 2000).

Estudos crónicos indicam valores de NOEC (*no observed effect concentration*) e LOEC (*lowest observed effect concentration*) de 0,005 e  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  para *Mysidopsis bahia* e de 0,1 a  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  para *D. magna* (Kersting e van Wijagaarden, 1992; Sved *et al.*, 1993). Zalizniak e Nugegoda (2006) observaram que concentrações subletais ( $0,005$  a  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) promovem toxicidades mais severas na 1ª geração do que nas restantes de *Daphnia carinata* expostas ao composto.

Apesar de exposições descontínuas, a um composto, podem promover uma menor mortalidade dos organismos, pois possibilitam a destoxificação e eliminação do composto do organismo (Breck, 1988), este processo não ocorre com o clorpirifos. Naddy *et al.* (2000) submeteram o crustáceo *D. magna* a concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 g L<sup>-1</sup> de clorpirifos e, observaram que esta exposição em intervalos de 6, 12 e 48h é suficiente para promover a morte do crustáceo.

No que respeita ao efeito estrogénico deste organofosforado, alguns autores indicam a diminuição do crescimento, da fecundidade e da viabilidade dos ovos no invertebrado aquático *Biomphalaria alexandrina*, quando exposto a concentrações de 125-500 g L<sup>-1</sup> (Ibrahim *et al.*, 1992).

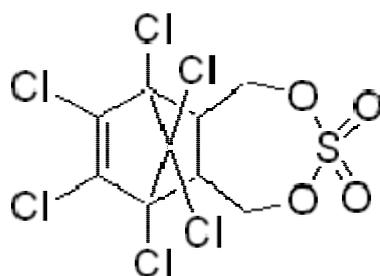
O clorpirifos é também muito tóxico para peixes de água doce. A aplicação de concentrações inferiores a 0,01 mg L<sup>-1</sup> promove a morte de peixes (USEPA, 1989). Estudos realizados em truta determinaram um valor de 96h-LC<sub>50</sub> de 0,009 mg L<sup>-1</sup> (USEPA, 1986). A exposição crónica de salmão, durante 200 dias, à formulação comercial de clorpirifos Dursban<sup>®</sup> (0,002 mg L<sup>-1</sup>), induziu a diminuição do número de juvenis com diminuição da sobrevivência e do crescimento, e o aumento das malformações (USPHS, 1995). O clorpirifos acumula-se nos tecidos dos organismos aquáticos, como observado em estudos crónicos com peixes na fase embrionária, com valores de bioconcentração entre 50 a 5 100 vezes a concentração na água (Racke, 1992). Devido à sua elevada toxicidade aguda e à sua persistência nos sedimentos este insecticida é considerado perigoso, para todos os organismos do ecossistema aquático (Schimmel *et al.*, 1983).

## ENDOSSFULFÃO SULFATO

Apesar do uso restrito dos organoclorados devido à sua elevada persistência ambiental, alguns organoclorados pertencentes à classe dos ciclodienos, nomeadamente o endossulfão, continuam a ser utilizados (Herrmann, 2003). O endossulfão apresenta uma baixa persistência ambiental e não é tóxico para os vertebrados, mas apresenta uma elevada toxicidade para os organismos aquáticos (deFur, 2004). O endossulfão é constituído por dois isómeros:  $\alpha$ -endossulfão e  $\beta$ -endossulfão (Herrmann, 2003). O endossulfão sulfato é um dos produtos da transformação do endossulfão, e é a forma mais persistente no meio aquático, deste insecticida, podendo apresentar tempos de semi-vida de dois a seis anos dependendo das condições ambientais, por isso é a forma mais frequentemente detectada nas águas superficiais (Herrmann, 2003; Wan *et al.*, 2005; Shivaramaiah *et al.*, 2005). As propriedades físico-químicas dos isómeros do endossulfão e do metabolito encontram-se descritas na Tabela 3 e a estrutura química do endossulfão sulfato está representada na Figura 8.

**Tabela 3.** Propriedades químicas dos isómeros do endossulfão e do metabolito endossulfão sulfato (Goerlitz e Eyrich, 1987; Ngabé e Bidleman, 2001).

	$\alpha$ - endossulfão	$\beta$ -endossulfão	Endossulfão sulfato
<b>Peso molecular (<math>\text{gmol}^{-1}</math>)</b>	406,93	406,93	422,9
<b>Ponto de Fusão (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	106-109	207-213	181-201
<b>Solubilidade em água, pH=5, <math>25^{\circ}\text{C}</math> (<math>\text{mgL}^{-1}</math>)</b>	0,33	0,32	0,22
<b>Pressão de Vapor, <math>25^{\circ}\text{C}</math> (Pa)</b>	$1,9\text{E}^{-03}$	$9,2\text{E}^{-05}$	$2,3\text{E}^{-05}$
<b>Constante Henry (<math>\text{Pa}\cdot\text{m}^3\text{mol}^{-1}</math>)</b>	0,7-12,9	0,04-2,12	$2,61\text{E}^{-05}$ $\text{atmm}^3\text{mol}^{-1}$
<b>Log Coeficiente de partilha octanol/água, pH=5,1</b>	4,63-4,74	4,34-4,79	3,66



**Figura 8.** Estrutura química do endossulfão sulfato (adaptado de GFEA, 2004).

No que respeita à toxicocinética o endossulfão é rapidamente degradado em metabolitos hidrossolúveis que são eliminados nos mamíferos pela urina, apresentando uma fraca absorção gastro-intestinal. A grande percentagem do composto que entra em contacto com o organismo é eliminado após alguns dias ou semanas (Smith, 1991).

O endossulfão actua no sistema nervoso central (ATSDR, 1990), na propagação do estímulo na fibra nervosa, através da: (i) inibição da acção do neurotransmissor ácido  $\gamma$  aminobutírico, fundamental para a absorção de cloro a nível da membrana da célula nervosa; e (ii) inibição da acção das enzimas ATPase de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e ATPase de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , localizadas nas terminações das membranas sinápticas (Klaassen, 2001).

A toxicidade do endossulfão sulfato e do seu precursor em mamíferos varia com a via de exposição, apresentando ambos uma elevada toxicidade aguda por via oral. Assim, estudos em ratos determinaram uma  $\text{LD}_{50}$  de 18 a  $160 \text{ mg Kg}^{-1}$  (Joshi *et al.*, 1981; Smith, 1991; RSCIS, 1991). A toxicidade por exposição dérmica também é acentuada apresentando valores de  $\text{LD}_{50}$  entre 78 e  $359 \text{ mg Kg}^{-1}$  (Smith, 1991; RSCIS, 1991). Para avaliação dos efeitos teratogénicos, administrou-se oralmente, em ratos, uma dose diária de  $2,5 \text{ mg Kg}^{-1}$  de endossulfão não se tendo observado quaisquer alterações em termos de reprodução, no entanto, quando se aumentou a dose para 5 ou  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ , foram observadas anomalias no baço dos juvenis (Smith, 1991). Assim, as evidências sugerem que a exposição por longos períodos pode promover mutagenicidade no homem (ATSDR, 1990).

Os efeitos ecotoxicológicos deste composto no ecossistema aquático são bastante acentuados.

Fisher (1985) determinou um NOEC de 560 g L<sup>-1</sup> de endossulfão para a alga verde *Scenedesmus subspicatus*, numa exposição de 72h. Para o endossulfão sulfato foram determinados valores de EC<sub>50</sub> entre 0,5 e 10 g L<sup>-1</sup> para a *Chlorella vulgaris* (Knauf e Schulze, 1973).

Ensaio de toxicidade aguda com invertebrados aquáticos indicam valores de LC<sub>50</sub> para o endossulfão entre 3,3 e 5,8 g L<sup>-1</sup> (Johnson e Finley, 1980). Magdza (1983) obteve um valor para o endossulfão de 48h-LC<sub>50</sub> de 0,3 g L<sup>-1</sup> para a *Daphnia longispina*. Outros estudos, com *D. magna*, determinaram valores de 48h-LC<sub>50</sub> de 740 g L<sup>-1</sup> e 150 g L<sup>-1</sup> (Lemke, 1980; ECC, 1998b, respectivamente). Barry *et al.* (1995) determinou valores de 48h-LC<sub>50</sub> para o endossulfão; +; +; endossulfão sulfato; e mistura + + endossulfão (50:50) de 478, 249, 205, 756 e 234 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

No que respeita à toxicidade crónica, Fernandez-Casalderrey *et al.* (1993) observaram uma diminuição da capacidade reprodutiva de invertebrados quando expostos a doses de 120 g L<sup>-1</sup> de endossulfão. Em ensaios crónicos de 21 dias, com *D. magna*, obtiveram-se valores de LC<sub>50</sub> de 130 e 170 g L<sup>-1</sup> e, valores de NOEC e LOEC, baseados no número médio de juvenis por *daphnia*, de 32 e 48 g L<sup>-1</sup>, respectivamente (Nebeker, 1982). Foram observadas alterações no desenvolvimento embrionário, reprodução e taxa de crescimento em *D. magna* para uma exposição a 200 g L<sup>-1</sup> (Heusel, 1991).

Estudos com endossulfão indicam que o seu efeito na *D. carinata* é influenciado pelo alimento (Barry *et al.*, 1995). Assim, quando os crustáceos são expostos a 320 g L<sup>-1</sup> de endossulfão, sem restrições alimentares, embora não ocorra mortalidade o tamanho dos seus ovos diminui significativamente.

O endossulfão é extremamente tóxico para algumas espécies de peixes apresentando valores de  $LC_{50}$  de 0,3 a 1,6  $g L^{-1}$  para a truta, em ensaios estáticos (Nebeker *et al.*, 1983) e, valores de  $LC_{50}$  entre 4,5 e 7,5  $g L^{-1}$  para a espécie *Channa punctata*, num ensaio semi-estático (Haider e Imbaray, 1986).

A concentração média estimada de protecção, em exposição aguda, para 95 % das espécies de peixes é de 0,14  $g L^{-1}$  (GFEA, 2004). Nos ensaios crónicos, os valores de NOECs encontram-se entre 0,05 e 0,4  $g L^{-1}$  (ECC, 1998c). Por exemplo, em ensaios de crescimento de 28 dias, com a espécie *Cyprinodon variegates*, obtiveram-se valores de NOEC de 0,4  $g L^{-1}$  (Hansen e Cripe, 1991).

O factor de bioconcentração em moluscos é de 600 vezes a concentração no ambiente aquático (USNLM, 1985), enquanto em peixes o factor de bioconcentração aumenta para valores entre 2400 a 11000 vezes (Jonsson e Toledo, 1993).

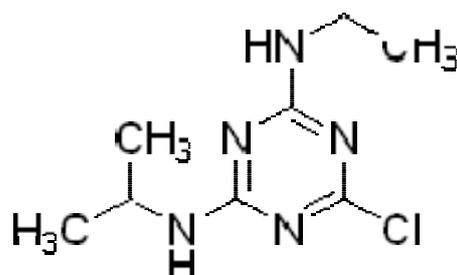
## ATRAZINA

Em Portugal, o uso das triazinas, nomeadamente da atrazina, tem vindo a aumentar, chegando as suas concentrações na água a exceder frequentemente os máximos admissíveis permitidos pela Legislação Europeia (ECC, 1998a). A atrazina é uma triazina selectiva usada para o controlo de ervas daninhas, nos cereais, árvores de fruto e beterraba.

Na Tabela 4 estão descritas as propriedades físico-químicas do herbicida atrazina, e na Figura 9 encontra-se representada a sua estrutura química.

**Tabela 4.** Propriedades químicas da atrazina (RSCIS, 1991).

	Atrazina
Peso molecular (gmol <sup>-1</sup> )	215,69
Ponto de Fusão (°C)	176
Solubilidade em água, 20°C (mgL <sup>-1</sup> )	28
Pressão de Vapor, 20°C (Pa)	0,04E <sup>-03</sup>
Coefficiente de Partilha	2,43
Constante de Henry, 25°C (atm.m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	2,36E <sup>-09</sup>



**Figura 9.** Estrutura química da atrazina (adaptado de Solomon *et al.*, 1996).

A atrazina é moderadamente solúvel na água. A literatura indica tempos de semi-vida de 30 a 300 dias nas massas de água (Yoo e Solomon, 1981, Glotfelty *et al.*, 1984). A hidrólise química seguida de biodegradação é provavelmente a principal via de eliminação deste herbicida das massas de água. A hidrólise é mais rápida em condições ácidas e básicas e, lenta em pH neutro (Huber, 1993). A pH 5, o tempo de semi-vida a 20°C é de 86 dias (Burkhard e Guth, 1981). A decomposição pela luz solar ocorre rapidamente. Por isso, as taxas de decomposição nas águas subterrâneas encontram-se em intervalos de 1,5 a 2 anos (Premazzi e Stecchi, 1990). Por outro lado, pode ser assumido que a taxa de degradação depende da composição química da água.

Águas de elevada salinidade aceleram a decomposição da atrazina (Glotfelty *et al.*, 1984; Isensee, 1984). Não está descrita uma elevada adsorção nos sedimentos, sendo o tempo de semi-vida nos sedimentos de 80 a 90 dias ou mesmo superior (Huber, 1983). A bioconcentração e volatilização, da atrazina, não são processos ambientalmente importantes (Howard, 1989).

Este herbicida inibe o transporte de electrões na fotossíntese através de alterações no fotossistema dois. A inibição da fotossíntese leva a alterações de processos como transpiração, abertura dos estromas, transporte iónico e outras reacções de que depende a produção de energia.

Estudos sugerem que este herbicida pode alterar o balanço fitohormonal e iónico nas plantas (Ebert e Dumford, 1976), o que pode promover uma desregulação nos processos metabólicos, em geral, afectando a síntese de RNA, enzimas e proteínas (Huber, 1993). Algumas plantas, como o milho, apresentam processos de destoxificação para este herbicida, o que pode justificar o seu uso de uma forma selectiva nestas culturas (Ebert e Dumford, 1976).

A atrazina é moderadamente tóxica para o homem e outros animais. Assim, em estudos realizados com ratos expostos a elevadas doses, observou-se efeitos de excitação seguida de depressão, diminuição dos batimentos cardíacos, espasmos musculares e hipotermia (Stevens e Sumner, 1991). Para além do referido, doses elevadas promovem ainda fraqueza muscular, diminuição da actividade, dificuldades respiratórias, convulsões e morte (USNLM, 1995). Os valores de  $LC_{50}$ , após exposição oral são: (i) em ratos de  $3\ 090\ mg\ Kg^{-1}$ , (ii) em murganhos de  $1\ 750\ mg\ Kg^{-1}$ , (iii) em coelhos de  $7\ 500\ mg\ Kg^{-1}$  e, (iv) em hamsters de  $1\ 000\ mg\ Kg^{-1}$ . A exposição por via inalatória é a que promove maior toxicidade, com valores de  $1h-LC_{50}$  superior a  $0,7\ mg\ Kg^{-1}$  e valores de  $4h-LC_{50}$  de  $5,2\ mg\ Kg^{-1}$  em ratos (Stevens e Sumner, 1991; RSCIS, 1991).

A toxicidade crónica foi avaliada em estudos de exposição oral de ratos a doses de 20 mg Kg<sup>-1</sup>dia<sup>-1</sup>, durante 6 meses. Nestes ensaios, ocorreu a morte de 40% dos animais com alterações respiratórias e paralisia dos membros. Alterações estruturais e químicas no cérebro, coração, fígado, pulmões, rins, ovários e sistema endócrino foram ainda observadas (Stevens e Sumner, 1991; USNLM, 1995). Não há evidências sobre as propriedades mutagénicas e teratogénicas da atrazina (Stevens e Sumner, 1991).

No que respeita aos seus efeitos carcinogénicos os estudos são inconclusivos. Assim, enquanto em murganhos expostos a doses orais de 21,5 mg Kg<sup>-1</sup>dia<sup>-1</sup> entre uma e quatro semanas seguido de uma dose diária de 82 mg Kg<sup>-1</sup> durante 17 meses, não se observou a formação de tumores, foram observados tumores mamários em ratos expostos durante toda a vida a elevadas doses de atrazina (Stevens e Sumner, 1991).

No que respeita aos efeitos tóxicos nas espécies do ecossistema aquático, estudos com macrófitas, nomeadamente, *Vallisneria americana*, mostraram uma redução da superfície das folhas a partir de concentrações de 3,2 g L<sup>-1</sup>, com um valor de 47d-EC<sub>50</sub> de 12 g L<sup>-1</sup>. A exposição desta espécie a concentrações de 75 g L<sup>-1</sup>, durante 12 a 28 dias, promoveu inibição da fotossíntese e determinou um valor de LC<sub>100</sub> de 120 g L<sup>-1</sup> (Corell e Wu, 1982). Por outro lado, Forney e Davis (1981) observaram uma diminuição de 29% no crescimento das plantas, após 6 semanas de exposição a uma concentração de 100 g L<sup>-1</sup> e, uma inibição de 36%, no mesmo período de exposição a uma concentração de 320 g L<sup>-1</sup>.

No que respeita ao fitoplankton, Butler *et al.* (1975) observaram sinais de diminuição no crescimento e na concentração de clorofila em células isoladas de alga, durante exposições entre 7 a 14 dias, submetidas a concentrações inferiores a 1 g L<sup>-1</sup>. Millie e Hersh (1987) utilizando as mesmas concentrações observaram um ligeiro decréscimo no processo fotossintético da diatomácea *Cyclotella meneghiniana*, logo após 5 minutos de exposição.

Valores de EC<sub>50</sub>, para a alga *S. subspicatus*, de 43 g L<sup>-1</sup> foram determinados após uma exposição de 72 horas (Solomon *et al.*, 1996). Pelo contrário, outros autores não observaram qualquer evidência do efeito tóxico da atrazina até concentrações de 100 g L<sup>-1</sup> (Moorhead e Kosinski, 1986).

Um teste de crescimento com a alga *Chlorella sp.*, realizado em laboratório por Premazzi e Stecchi (1990), permitiu determinar um EC<sub>50</sub> de 25 g L<sup>-1</sup>, após 11 dias de exposição. Locket *et al.* (2006) observaram que as algas verdes são mais sensíveis aos efeitos da atrazina que as diatomáceas e as cianobactérias.

No que respeita ao zooplâncton, estudos com o crustáceo marinho *Acartia tonsa* indicaram que este é um dos organismos mais sensíveis aos efeitos directos da atrazina, com um 96h-LC<sub>50</sub> de 94 g L<sup>-1</sup> (Ward e Ballantine, 1985). No caso dos crustáceos de água doce os valores de 48h-LC<sub>50</sub> encontram-se entre 3 050 g L<sup>-1</sup> e 6 900 g L<sup>-1</sup>, para *D. carinata* e *D. magna*, respectivamente (Pott, 1982; Macek *et al.*, 1976). Latt Phyu *et al.* (2004) determinaram um valor de 48-h EC<sub>50</sub> de 24,6 mg L<sup>-1</sup> para a *D. carinata*.

Testes de exposição crónica conduzidos com várias gerações de *D. magna*, durante 64 dias, determinaram valores de NOEC de 140 g L<sup>-1</sup> e 200 g L<sup>-1</sup> (Macek *et al.*, 1976; Streit e Peter, 1978). Dodson *et al.* (1999a) observaram que a produção de juvenis de *D. magna* não foi afectada para concentrações de 0,5 mg L<sup>-1</sup>, num ensaio de 6 dias. Por outro lado, Kaushik *et al.* (1985) observaram efeitos na reprodução para exposições crónicas a concentrações de atrazina 0,2 mg L<sup>-1</sup>. Em ensaios crónicos com os invertebrados, *Chironimus tetans* e *Gammarus fasciatus*, determinaram-se valores de NOEC de 230 e 140 g L<sup>-1</sup>, respectivamente (Macek *et al.*, 1976).

Os valores de LC<sub>50</sub> obtidos para o camarão *P. duorarum* foram de 6900 g L<sup>-1</sup>, e para o caranguejo *Neopanope texana* foram de 100 000 g L<sup>-1</sup> (Eisler, 1989).

A atrazina apresenta uma baixa toxicidade aguda para peixes e baixos níveis de acumulação, sendo os órgãos de armazenamento o cérebro e o fígado (USNLM, 1995). Assim, estudos agudos realizados com carpa, *Cyprinus carpio*, determinaram efeitos tóxicos após exposição a concentrações entre 100 e 1000 g L<sup>-1</sup>, durante 96 horas (Alabaster, 1969).

## DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO ECOSISTEMA AQUÁTICO

A associação entre contaminação química dos ecossistemas e o aparecimento de doenças, decréscimo das taxas de reprodução, e morte das espécies começou a fazer sentido por volta de 1947 (Markey *et al.*, 2003). Muitos dos efeitos observados eram similares aos observados para os moduladores hormonais, o que indicava que o declínio das espécies era promovido por exposição a compostos com propriedades hormonais (Wingspread, 1991).

Assim, nas últimas duas décadas tem aumentado o interesse científico e o debate público sobre o potencial efeito adverso da exposição a um grupo de poluentes ambientais, globalmente denominados por DEs, que têm a capacidade de interferir com a síntese, secreção, transporte, ligação, acção ou eliminação das hormonas naturais responsáveis pela manutenção da homeostasia, reprodução, desenvolvimento e comportamento das espécies (IPCS, 2002).

Os DEs podem entrar no ecossistema aquático por várias vias: (i) descarga directa na massa de água; (ii) descarga por efluentes domésticos e industriais, principalmente como resultado de um ineficiente tratamento de águas residuais (Lopez de Alda *et al.*, 2001; Bruchet *et al.*, 2002); e (iii) lixiviação dos químicos aplicados na agricultura (Körner *et al.*, 1999; Larsson *et al.*, 1999; Falconer *et al.*, 2006).

Vários poluentes ambientais apresentam características de desregulação endócrina: (i) pesticidas como o diclorodifeniletano (DDT) (Kelce *et al.*, 1995), dieldrina, lindano e endossulfão (Fry, 1995); (ii) contaminantes químicos industriais como as dioxinas, tributilestanho, compostos organoclorados policíclicos (PCBs) (Jobling *et al.*, 1995), alquilfenóis (USEPA, 1997), bisfenol A (Lyons, 2000); (iii) metais (Telismän *et al.*, 2000); e (iv) estrogénios sintéticos (Newbold, 1995).

A desregulação endócrina pode ocorrer por diferentes mecanismos de acção fisiológicos (Rodrigues *et al.*, 2007): (i) alterando (inibindo ou activando) a secreção hormonal; (ii) interferindo com o receptor hormonal, por exemplo o dietilstilbestrol (DES) mimetiza a hormona endógena ligando-se ao respectivo receptor estrogénico, exercendo por isso um efeito agonista (McLachlan, 1993), outras substâncias exercem um efeito antagonista, bloqueando os receptores específicos de determinada hormona endógena, como é o caso dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (Indarto *et al.*, 2001; Mueller, 2004); (iii) modificando o metabolismo de circulação hormonal, por aumento ou diminuição da excreção das hormonas naturais e/ou biotransformação no fígado ou noutros órgãos, como os pesticidas organoclorados (Bradlow *et al.*, 1995).

Os efeitos biológicos promovidos pelos DEs são influenciados pelas características estruturais dos compostos, pois a similaridade estrutural permite a interacção com os receptores celulares (Tabira *et al.*, 1999). Estes compostos apresentam propriedades comuns, tais como, persistência ambiental nos diversos compartimentos abióticos, fácil transporte através do ar, e acumulação na cadeia trófica (expondo os animais superiores, incluindo o Homem, a maiores riscos) (Meyer *et al.*, 1999; Lopez de Alda *et al.*, 2001).

Por outro lado, é aceite que os DEs têm uma actividade estrogénica mais fraca que as hormonas endógenas (Markey *et al.*, 2003). Apesar desse facto, está comprovado que estes compostos actuam com as hormonas naturais por processos aditivos e por isso causam efeitos cumulativos, o que explica como é que quantidades tão pequenas destes poluentes podem ter um impacte negativo tão acentuado quando em presença das hormonas endógenas (Degen *et al.*, 2000; Harrison, 2001; Silva *et al.*, 2002). Para além disso, os efeitos biológicos promovidos por alguns DEs são descritos por curvas dose-resposta invertidas, ou seja, baixas doses do composto promovem efeitos tóxicos mais acentuados (Degen *et al.*, 2000; Harrison, 2001). Este fenómeno foi descrito para a exposição fetal de ratos a doses crescentes de estradiol e dietilstilbestrol (DES) (vom Saal *et al.*, 1997) e de bisfenol A (Nagel *et al.*, 1997). Um estudo realizado com bisfenol A, em ratos, concluiu que o composto induz uma curva em forma de U, o que indica que o aumento da toxicidade no aparelho reprodutor ocorre em baixas e altas doses, em relação às doses intermédias (EDSTAC, 1998).

Para além do atrás referido, alguns factores como o tipo e o tempo de exposição, a biodisponibilidade do composto, e o seu processo de biotransformação e excreção, podem influenciar a sua acção e a respectiva resposta do organismo (Toppari *et al.*, 1996; Kavlock *et al.*, 1996).

O efeito tóxico dos DEs varia de acordo com a idade a que o organismo é exposto (Markey *et al.*, 2003). Estudos demonstram que a fase de desenvolvimento embrionário é das mais sensíveis à actuação deste tipo de compostos (Bern, 1992). Assim, observou-se o aparecimento de adenocarcinoma da vagina em descendentes de mulheres que estiveram expostas ao DES na 13<sup>a</sup> semana de gestação (Hatch *et al.*, 2001). Markey *et al.* (2001) concluíram que a exposição fetal a bisfenol A promove alterações no desenvolvimento e organização dos tecidos das glândulas mamárias de ratos fêmeas adultos em concentrações 4 000 vezes inferiores às necessárias para obter o mesmo efeito em animais na fase de pré-puberdade.

No que respeita, aos efeitos induzidos por estes agentes no Homem, vários autores referem efeitos similares aos encontrados em animais selvagens, que podem afectar tanto o crescimento como a capacidade reprodutora das populações (Danzo 1998; Amaral, 2002). Os efeitos que têm sido descritos incluem a diminuição da qualidade de esperma humano (Carlsen *et al.*, 1992; Rozati *et al.*, 2002; Safe, 2002), efeitos neurológicos, por exposição pré-natal, que se mantêm na idade adulta (Singleton e Khan, 2003), alterações do sistema imunitário como imunossupressão, aumento da frequência de certas doenças infecciosas, exacerbação de alergias e de doenças autoimunes (Schuurman *et al.*, 1991; IPCS, 2002) e aumento da incidência de certos tipos de cancro (Davis *et al.*, 1993; IPCS, 2002; Safe, 2002). Assim, a exposição pré-natal, a PCBs e a dioxinas, foi associada a efeitos tóxicos no desenvolvimento neurológico de crianças, tais como atrasos psicomotores e cognitivos (Stewart *et al.*, 2003). Por outro lado, a relação causal estabelecida, em estudos epidemiológicos, entre exposição a estrogénios sintéticos e aparecimento de efeitos tóxicos no sistema reprodutor do Homem está bem fundamentada. A exposição precoce de mulheres a elevadas doses de DES promove o aparecimento de cancro e malformações nos órgãos reprodutivos (Nollar *et al.*, 1990).

Estudos evidenciaram que, a exposição de mulheres grávidas ao estrogénio sintético dietilstilbestrol promoveu o aparecimento de várias anomalias nos descendentes machos, incluindo problemas de fertilidade e elevado risco de cancro testicular (Henderson *et al.*, 1976; Gill *et al.*, 1977; Sharpe e Skakkebaek, 1993; Moller *et al.*, 1996). Pelo contrário, alguns estudos epidemiológicos de associação causal entre a exposição humana a pesticidas e o aparecimento de efeitos tóxicos não obtiveram resultados conclusivos (Falconer *et al.*, 2006).

Os efeitos induzidos por estes agentes em animais selvagens incluem a redução da capacidade reprodutiva de certas espécies de peixes (Borton e Davis, 1994) e aves, com o aparecimento de disfunções como decréscimo da fertilidade, carcinomas do sistema reprodutor e alterações do sistema imunológico (IPCS, 2002). Vários pesticidas e químicos industriais induzem alterações endócrinas em peixes e invertebrados. Assim, a exposição a alquilfenóis foi associada a efeitos estrogénicos em peixes (Jobling *et al.*, 1995). De entre os pesticidas frequentemente utilizados na actividade agrícola a atrazina, a simazina, o endossulfão, o metoxicloro, o fenitrotião, são considerados compostos que apresentam actividade endócrina. A atrazina diminui as taxas de reprodução em certas espécies de peixes (IPCS, 2002). Fitzmayer *et al.* (1982) observaram efeitos na frequência de mudança de carapaça e na capacidade reprodutiva em organismos da espécie *Daphnia pulex* quando da exposição a concentrações entre 4 a 20 mg L<sup>-1</sup> de simazina. No que respeita ao efeito estrogénico dos organoclorados, alguns autores indicam que actuam como agonistas dos receptores estrogénicos, apresentando capacidade de ligação a estes receptores e activando-os (Giesy *et al.*, 2002). O finopronilo e o metopreno são insecticidas que actuam no sistema juvenóide dos invertebrados, alterando a frequência da mudança do exoesqueleto e do crescimento de insectos, bem como o desenvolvimento sexual de moluscos e de crustáceos.

Na Tabela 5 encontram-se alguns compostos ou grupos de compostos conhecidos como específicos desreguladores do sistema endócrino dos invertebrados.

**Tabela 5.** Exemplos de desregulação endócrina em invertebrados (deFur, 2004)

Composto	Espécie	Efeitos
<b>Bisfenol A</b>	Cobras - <i>Maris cornuarietis</i> ; <i>Nucella lapillus</i>	Redução/ aumento órgão reprodutivo (Oehlmann <i>et al.</i> , 2000)
<b>Octilfenol</b>	Cobras - <i>Maris cornuarietis</i> ; <i>Nucella lapillus</i>	Redução/aumento órgão reprodutivo (Oehlmann <i>et al.</i> , 2000)
<b>Nonilfenol</b>	Ostra <i>Crassostrea gigas</i>  <i>Daphnia magna</i>	Feminização/alteração da razão de sexos (Nice <i>et al.</i> , 2003)  Alterações no desenvolvimento embrionário (LeBlanc <i>et al.</i> , 2000)
<b>Tributil- -estanho</b>	Abalone (molusco) - <i>Haliotis gigantea</i>	Masculinização das fêmeas (Horiguchi <i>et al.</i> , 2002)
<b>Endossulfão</b>	Camarão - <i>Palaemonetes pugio</i>	Mortalidade aguda; eclosão embrionária tardia (Wirth <i>et al.</i> , 2001)
<b>Metropreno</b>	Camarão- <i>Palaemonetes pugio</i>	Mortalidade aguda; eclosão embrionária tardia; alteração do crescimento (Wirth <i>et al.</i> , 2001; Mackenney e Celestial, 1993)
<b>Fipronilo</b>	Copepode- <i>Amphiascus tenuiremis</i>	Infertilidades dos machos (Chandler <i>et al.</i> , 2004)

## AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Em 1998, a Agência de Protecção Ambiental em parceria com o grupo “Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Commity” (EDSTAC), começaram a desenvolver esforços na implementação de um conjunto de metodologias para a avaliação das características de desregulação endócrina de poluentes ambientais (Charles, 2004; Wang *et al.*, 2005). Assim, as metodologias recomendadas estão integradas em duas etapas: (i) 1ª etapa, engloba os ensaios de *screening*, ensaios preliminares *in vitro* e *in vivo*, para a avaliação das características estrogénicas, androgénicas e efeitos na tiróide das substâncias perigosas (Tabela 6); (ii) 2ª etapa, onde são realizados ensaios de multi-geração (*in vivo*) com a finalidade de estabelecer uma dose de segurança, ou seja, o NOEC para cada composto avaliado (Tabela 7).

Os ensaios *in vitro* englobam a realização de quatro metodologias de *screening*: ligação ao receptor-estrogénio/ativação transcricional; ligação ao receptor-androgénio/ativação transcricional; esteroidenogénese (detecção de substâncias que interferem com a produção de esteróides por inibição de qualquer uma das etapas da biossíntese da testosterona) (Gray *et al.*, 1995; Laskey *et al.*, 1995); aromatase placentária (teste alternativo para detectar substâncias que interferem com a aromatase, enzima que converte a testosterona em estradiol) (Charles, 2004). Os dois primeiros grupos de ensaios assentam nos modelos clássicos da actuação de receptores. Os receptores em causa incluem o receptor estrogénio (RE) que apresenta duas isoformas RE $\alpha$  (Green *et al.*, 1986) e RE $\beta$  (Kuiper *et al.*, 1996) e o receptor androgénio (RA) (Lubahn *et al.*, 1988). Os ensaios de esteroidenogénese e da aromatase placentária têm como objectivo a identificação de poluentes que interferem com a biossíntese esteróide ou alteram os níveis endógenos das hormonas esteróides (Miyamoto e Burger, 2003).

Os ensaios *in vivo* integrados na 1ª etapa são testes agudos e que se encontram em fase de validação, utilizando para isso compostos já identificados como possuidores de propriedades estrogénicas, tais como o 4-nonilfenol, o bisfenol A e o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) (Kanno *et al.*, 2003; Gelbeke *et al.*, 2004).

**Tabela 6.** Descrição dos bioensaios de *screening* (*in vitro* e *in vivo*) da 1ª etapa de avaliação de desreguladores endócrinos recomendados pela EDSTAC (Erikson, 1998).

<i>In vitro</i>
Ligação ao receptor-estrógeno/ativação transcripcional Ligação ao receptor-androgénio/ativação transcripcional Esteroidenogénese Aromatase placentária
<i>In vivo</i>
Teste uterotrófico em ratos, duração 3 dias (ensaios para estrogénicidade) Teste de puberdade em ratos, duração 20 dias (ensaio para avaliação de efeitos na tiróide e estrogénicos, baseado na idade vaginal) Teste Hershberger, exposição de ratos durante 5-7 dias (ensaios para androgenicidade) Teste com ratos machos adultos duração 14 dias (para detecção de efeitos nos órgãos reprodutivos sensíveis aos androgénios e a substâncias que inibem a produção de testosterona) Teste de puberdade em tiróide de ratos machos, duração de 20 dias (para detecção de androgénios e anti-androgénios) Teste de metamorfose em rãs (detecção de efeitos na tiróide, por observações de alterações na extremidade do corpo) Teste de recrudescência em gónadas de peixe (detecção de substâncias que afectam a maturação de peixes).

**Tabela 7.** Descrição dos bioensaios *in vivo* da 2ª etapa de avaliação de desreguladores endócrinos, recomendados pela EDSTAC (Erikson, 1998).

<p><b>Testes em Mamíferos</b></p> <p>Ensaio de reprodução em 2 gerações de mamíferos</p> <p>Teste de reprodução numa geração (alternativo ao teste anterior)</p>
<p><b>Testes para outros <i>phyla</i> animais</b></p> <p>Teste de reprodução em aves</p> <p>Teste de avaliação do ciclo de vida do <i>Fathead minnow</i></p> <p>Teste de avaliação do ciclo de vida do <i>Americamysis</i> (mysid, artrópode)</p> <p>Teste de reprodução e desenvolvimento em anfíbios (<i>Xenopus</i>)</p>

Os ensaios da 2ª etapa são ensaios de longa duração, que abrangem praticamente todo o ciclo de vida dos organismos teste. Este conjunto de testes utiliza uma diversidade de espécies com diferentes susceptibilidades e sensibilidades aos tóxicos com propriedades endócrinas. Para os invertebrados a espécie recomendada é o *Mysid shrimp*. No entanto, esta espécie é recomendada só na 2ª etapa do processo de avaliação, o que implica que o químico foi testado somente nos vertebrados na 1ª etapa e quando apresentou actividade endócrina foi testado nas diferentes espécies, na 2ª etapa (Wang *et al.*, 2005). Vários autores apoiam a necessidade de introdução de bioensaios com invertebrados na 1ª etapa de avaliação de risco, pois já se conclui que os invertebrados podem ser sensíveis a compostos que não promovem efeitos nos vertebrados, pois apresentam sistemas hormonais distintos. Este facto, pode levar a não identificação de compostos com propriedades endócrinas que podem promover alterações ecológicas relevantes nos níveis tróficos inferiores do ecossistema aquático (deFur, 1999; Hunchinson *et al.*, 2000; Oberdorster e Cheek, 2001; deFur, 2004).

Assim é necessário incluir na avaliação de risco ambiental o estudo dos efeitos no sistema endócrino de crustáceos pois podem dar-nos informações úteis sobre poluentes com características endócrinas, que podem interferir noutros sistemas hormonais que não no estrogénico e, por isso, que são também de extrema importância para avaliar o risco de alterações na estrutura dos ecossistemas (Hutchinson, 2002).

A integração do ensaio com *Mysid shrimp* baseou-se na sua sensibilidade e no seu uso durante várias décadas em toxicologia aquática (ASTM, 1993). Este ensaio permite pelo menos detectar alguns efeitos no sistema endócrino dos artrópodes.

Neste contexto, surge a necessidade de incorporação de outros ensaios com invertebrados na metodologia proposta pela EDSTAC, o que permitirá uma melhor prevenção do risco ecológico.

Vários factores fundamentam a inclusão de maior número de ensaios com invertebrados nos programas de avaliação, controlo e regulação de DEs: (i) os invertebrados são elementos essenciais em todos os ecossistemas, constituem cerca de 95% de entre as espécies aquáticas e terrestre (Wilson, 1999); (ii) constituem o alimento de espécies de níveis tróficos superiores (Guillette e Crain, 2000); (iii) a utilização de ensaios em invertebrados pode ser útil na previsão de potenciais DEs em vertebrados, pois os invertebrados conseguem ser mais facilmente manipulados, os testes são menos dispendiosos e de menor duração, e são espécies que apresentam tempos de semi-vida menores (Guillette e Crain, 2000); (iv) desde os anos 60, os invertebrados são utilizados para a determinação dos limites de segurança dos compostos químicos; (v) no ecossistema aquático a monitorização de invertebrados permite a obtenção de informação sobre a qualidade da água superficial (Parr e Mason, 2003; Hering *et al.*, 2006).

Na Tabela 8 estão descritos alguns exemplos de ensaios de desregulação utilizando invertebrados. De entre os ensaios com invertebrados, os investigadores têm atribuído relevância a ensaios que utilizam os copépodes, invertebrados bentónicos (*Amphiascus tenuiremis*; Chandler e Green, 2001; Kusk and Wollenberg, 2007), *Mysids* (Verslycke *et al.*, 2007) e pulga de água (*D. magna*; LeBlanc *et al.*, 2000; Tatarazako e Oda, 2007).

**Tabela 8.** Exemplos de bioensaios utilizados na avaliação de desregulação endócrina em invertebrados (deFur, 2004)

<b>Grupo de Organismos</b>	<b>Ensaio</b>	<b>Parâmetros de Avaliação</b>
<b>Insectos</b>	Exposição de formas larvas jovens Ensaios <i>in vitro</i> com células da epiderme do insecto <i>Maduca sexta</i> Formas larvares de mosquito: evita a eclosão dos adultos	Metamorfose precoce Inibição da síntese de vitelogenina Fecundação Mortalidade dos ovos
<b>Insectos/ Crustáceos</b>	Linhas celulares de resposta aos receptores ecdiesteróide Ensaios de 96 horas e de multigeracões com <i>mysid shrimp</i> e <i>grass shrimp</i>	Inibição da mudança de carapaça Inibição da produção de ovos Reprodução: produção e viabilidade de ovos, razão de sexos e sobrevivência
<b>Crustáceos</b>	Ensaios de reprodução de 21 dias com <i>D. magna</i> <sup>(a)</sup>	Inibição da mudança de carapaça Anomalias nos juvenis Diferenciação sexual

<sup>a</sup>Tatarazako e Oda, 2007.

Como atrás foi referido dois dos ensaios com invertebrados propostos para a avaliação das propriedades de desregulação endócrina de poluentes, são o ensaio do ciclo de vida com *mysid* (Verslycke *et al.*, 2007) e o ensaio de reprodução e desenvolvimento com copepodes (Kusk e Wollenberg, 2007). No entanto, os ensaios com estas espécies apresentam alguns aspectos que dificultam a sua normalização (Tatarazako e Oda, 2007): (i) o sistema endócrino destas espécies não está bem caracterizado, o que leva a que seja mais difícil o estabelecimento de parâmetros de avaliação nos ensaios; (ii) estas espécies não se reproduzem por partenogénese cíclica, nem apresentam alterações de sexo por variabilidade de factores ambientais; (iii) não foram observadas até agora alterações da razão de sexos para concentrações dose-dependentes de hormonas juvenóides ou seus análogos; e (iv) nestas espécies ainda não foi observada a interferência no processo de mudança de carapaça quando da exposição a químicos com propriedades ecdiesteróides (Tatarazako e Oda, 2007).

No presente trabalho de investigação a avaliação das características de desregulação dos pesticidas foi realizada com o crustáceo *D. magna*, espécie muito utilizada para avaliação do impacte toxicológico de poluentes nas massas de água, e que tem revelado ser uma espécie muito sensível para análise de poluentes com características juvenóides e ecdiesteróides (Wang *et al.*, 2005; Gourmelon e Ahtiainen, 2007).

No que respeita à avaliação de alterações do sistema juvenóide dos crustáceos, estudos recentes demonstraram que a produção de machos na *D. magna* é induzida após a exposição a hormonas juvenóides ou a pesticidas que mimetizam as hormonas juvenóides (Olmstead e LeBlanc, 2002; Tatarazako *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2005). Assim, a produção de machos é considerada por muitos autores um parâmetro de avaliação muito específico/sensível para a avaliação da actividade juvenóide de poluentes ambientais (Tatarazako e Oda, 2007).

Na avaliação de alterações do sistema ecdiesteróide, outro dos sistemas hormonais dos crustáceos, está também descrita a sensibilidade da *D. magna*, bem como os *endpoints* utilizados neste tipo de ensaio, a frequência de mudança de carapaça, e o desenvolvimento de anomalias nos juvenis.

## SISTEMA ENDÓCRINO DOS CRUSTÁCEOS

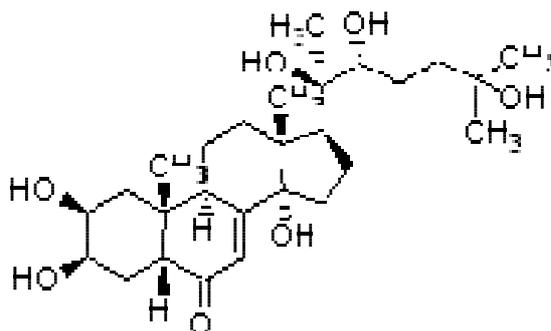
A regulação das funções biológicas é uma característica comum a todos os *phyla*, incluindo os invertebrados. Apesar da estratégia de regulação endócrina dos processos biológicos estar bastante conservada (McLachlan, 2001) e muitos tipos de mensageiros hormonais serem partilhados por várias espécies, ocorreu uma especialização dos componentes do sistema endócrino dentro dos vários *phyla* o que resultou em diferenças específicas entre grupos. Por exemplo, os vertebrados utilizam o estrogénio e a testosterona, enquanto os artrópodes utilizam o esteróide ecdisona. No entanto, pensa-se que há similaridades suficientes entre o sistema endócrino dos vertebrados e artrópodes que permite que um composto que actua num sistema possa promover desregulação no outro (Zou e Fingerman, 1997).

Assim, por exemplo, o insecticida metopreno (hormona juvenil sintética, que controla o desenvolvimento dos artrópodes) pode activar a transcrição do gene com informação para a síntese do receptor dos retinóides X (RRX) nos mamíferos (Harmon *et al.*, 1995). Por outro lado, os esteróides dos vertebrados podem ser sintetizados pela *Daphnia sp.*, espécie muito sensível aos androgénios dos vertebrados (Baldwin *et al.*, 1995). Tais factos sugerem que há uma classe específica de químicos que pode ter efeitos nos vertebrados e invertebrados.

Os crustáceos utilizam uma variedade de cascatas de sinalização neuroendócrina na sua regulação fisiológica (LeBlanc, 2007). Nos últimos anos os toxicologistas reconheceram que alguns destes mecanismos são muito susceptíveis à acção de químicos ambientais, o que resulta em vários efeitos tóxicos que podem comprometer a sustentabilidade populacional das espécies (Oehlmann e Schulte-Oehlmann, 2003).

Nos crustáceos a actividade hormonal é regulada por dois grupos de hormona/receptor: juvenóides e ecdiesteróides (LeBlanc *et al.*, 1999). Os juvenóides são estruturalmente similares aos retinóides dos vertebrados (Nijhout, 1998), enquanto os ecdiesteróides partilham alguns aspectos de similaridade com os estrogénios e androgénios dos vertebrados (De Loof e Huybrechts, 1998).

Os ecdiesteróides são moléculas de sinalização que estão bem caracterizadas no que respeita ao seu papel na regulação do processo de mudança de carapaça e do normal desenvolvimento embrionário nos crustáceos (Souty *et al.*, 1982; Mu e LeBlanc, 2002b; Gunamalai *et al.*, 2004). Nos crustáceos, a principal hormona deste grupo é a 20-hidroxicdisone (20-HE, Fig. 10) (LeBlanc, 2007). Os ecdiesteróides (nomeadamente a 20-HE) promovem as suas actividades reguladoras por ligação ao receptor ecdiesteróide (REc-NR1H1). O receptor REc regula a transcrição genómica em associação com o receptor retinóide X (RRX) (LeBlanc, 2007).



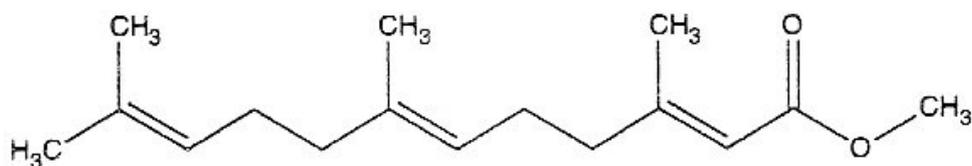
**Figura 10.** Estrutura química da hormona 20-HE (adaptado de LaFont, 2000).

A mudança de carapaça é um processo fundamental no desenvolvimento dos crustáceos pois possibilita o seu crescimento e maturação (LeBlanc e McLachlan, 1999). Os ecdiesteróides estão sob o controlo negativo da “hormona de inibição de mudança de carapaça” (HIM), que mantém baixos os níveis de ecdiesteróides em circulação, durante o período entre mudas. No período anterior à mudança de carapaça, os níveis de HIM em circulação diminuem com o conseqüente aumento dos níveis de ecdiesteróides o que, induz o processo de mudança de carapaça com a libertação do velho exosqueleto e a substituição por uma nova cutícula (LeBlanc, 2007).

No que respeita ao papel dos ecdiesteróides no desenvolvimento embrionário, está descrito que os embriões do crustáceo *D. magna* contêm uma elevada quantidade de ecdiesteróides, proveniente da progenitora, para a utilização nas primeiras fases de desenvolvimento embrionário (Subramoniam, 2000). A privação da hormona, por inibição de síntese na progenitora ou pela presença de um antagonista do receptor ecdiesteróide no embrião, promove atrasos no desenvolvimento embrionário ou mesmo perda do embrião (Mu e LeBlanc, 2002a). Nas últimas fases de desenvolvimento embrionário, o embrião sintetiza nova hormona ecdiesteróide (Mu e LeBlanc, 2002b), que ao ser inibida pode promover o aparecimento de anomalias no crustáceo. Alguns estudos sugerem ainda que as hormonas ecdiesteróides estimulam a produção de vitelogenina durante a maturação do oócito no ovário (Souty *et al.*, 1982).

Alguns compostos com actividade anti-ecdiesteróide como o bisfenol A, 4-nonilfenol, DDT e a dieldrina actuam como inibidores da síntese de ecdiesteróides ou como antagonistas do receptor ecdiesteróide (Dinan *et al.*, 2001). Estudos demonstram que os efeitos anti-ecdiesteróide promovidos por químicos ambientais podem ser minorados pela co-administração de 20-HE (Mu e LeBlanc, 2002a,b).

Os juvenóides regulam vários aspectos do desenvolvimento, crescimento, maturação e reprodução nos artrópodes (Truman e Riddiford, 2002). Exemplos de juvenóides são a hormona juvenil III nos insectos e, o metilfarnesoato nos crustáceos (Fig. 11) (Laufer *et al.*, 1993; Riddiford, 1985). O metilfarnesoato é a maior hormona terpenóide do sistema endócrino dos crustáceos, já quantificada em mais de 30 espécies de crustáceos incluindo caranguejos, camarões de água doce e salgada e perceves (Laufer e Biggers, 2001). O receptor responsável pela activação da síntese de metilfarnesoato nos crustáceos ainda não foi identificado. No entanto, está descrito a actuação do receptor RRX (receptor retinóide X) na estimulação da hormona juvenil na *Drosophila* e pensa-se que este receptor pode desempenhar um papel similar para o metilfarnesoato nos crustáceos, dada a semelhança estrutural entre as duas hormonas. Para além disso, estudos indicam que a hormona juvenil é capaz de mimetizar a acção do metilfarnesoato em algumas espécies de crustáceos (Tatarazo *et al.*, 2003) no entanto, essa acção ocorre para concentrações muito elevadas (Davey, 2000).



**Figura 11.** Estrutura química do composto metilfarnesoato (adaptado de LaFont, 2000).

Estudos demonstram que o metilfarnesoato influencia a maturação reprodutiva nos caranguejos e camarões, pela estimulação de produção de vitelogenina e de ovos (Rodriguez *et al.*, 2002; Mak *et al.*, 2005). Ainda nestas espécies a hormona estimula a maturação das gónadas, pelo aumento de massa dos testículos e dos ovários (Laufer *et al.*, 1998; Reddy e Ramamurthi, 1998; Kalavathy *et al.*, 1999). O metilfarnesoato é um determinante sexual no crustáceo *D. magna*, elevados níveis desta hormona nas progenitoras promovem a produção de machos (Olmstead e LeBlanc, 2002; Tatarazako *et al.*, 2003; Rider *et al.*, 2005). O efeito na determinação do sexo é restrito às últimas fases da maturação do oócito no ovário (Olmstead e LeBlanc, 2002). Quando os ovos são transferidos para o marsúpio o sexo já está definido. Estudos laboratoriais mostraram que níveis intermédios de metilfarnesoato estimulam a produção de ninhadas conjuntas de machos e fêmeas (Olmstead e LeBlanc, 2002; LeBlanc, 2007). Está demonstrado que alguns pesticidas que regulam o crescimento de insectos, mimetizam a acção do metilfarnesoato alterando as taxas sexuais na *D. magna* (Olmstead e LeBlanc, 2003; Tatarazako *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2005a). Alguns destes compostos (fenoxicarbe e piriproxifeno) são potentes agonistas do metilfarnesoato e estimulam a produção de machos em concentrações muito baixas (Oda *et al.*, 2005b; Rider *et al.*, 2005). Vários estudos indicam que os sistemas juvenóide e ecdiesteróide nos crustáceos encontram-se coordenados e interligados, o que leva a que possam modular funções entre eles. Assim, Mu e LeBlanc (2004) observaram que os juvenóides inibem processos que estão sob o controlo positivo dos ecdiesteróides. Por outro lado, a exposição do crustáceo *D. pulex*, a baixas doses de hormona 20-HE promoveu o aparecimento de machos (Peterson *et al.*, 2001).

## OBJECTIVOS DO ESTUDO

Este estudo tem como objectivo a avaliação da toxicidade e das características de desregulação endócrina da atrazina, clorpirifos e endossulfão sulfato. Para responder ao objectivo proposto foram desenvolvidos um conjunto de ensaios com a finalidade de: (i) avaliar a toxicidade aguda dos pesticidas; (ii) avaliar a sua toxicidade crónica; e (iii) avaliar as suas propriedades de desregulação do sistema endócrino do crustáceo *D. magna*.



## **CAPÍTULO IV**

**TOXICIDADE AGUDA DA ATRAZINA, DO ENDOSSULFÃO SULFATO E  
DO CLORPIRIFOS NO *VIBRIO FISHERI*, *THAMNOCEPHALUS PLATYURUS* E  
*DAPHNIA MAGNA***



## Resumo

Os efeitos toxicológicos agudos do herbicida atrazina e dos insecticidas endossulfão sulfato e clorpirifos foram avaliados recorrendo a um grupo de ensaios com organismos de dois níveis tróficos, do ecossistema aquático. De acordo com as categorias de toxicidade estabelecidas pela Legislação Europeia, a atrazina não é considerada uma substância perigosa para as espécies testadas, enquanto os insecticidas podem ser considerados muito tóxicos para os crustáceos. Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda mostraram que o *Thamnocephalus platyurus* foi o organismo mais sensível e, o *Vibrio fisheri* foi o mais resistente. O clorpirifos foi o único dos pesticidas em estudo, que apresentou um potencial risco ecológico no ecossistema aquático da albufeira do Alqueva, uma vez que foi detectado nas águas em concentrações similares às que promovem efeitos tóxicos.

#### IV.1. Introdução

O uso de pesticidas na agricultura pode promover a contaminação das águas de superfície e subterrâneas, por precipitação, arrastamento pelo vento e por processos de lixiviação (Cerejeira *et al.*, 2003). A região do Alentejo é uma importante área agrícola do Sul de Portugal. Os insecticidas endossulfão sulfato e clorpirifos e o herbicida atrazina são três dos pesticidas usados na região. Estes compostos, foram seleccionados para o estudo toxicológico, tendo em consideração, quer a sua relevância ambiental quer a sua frequência de utilização. O herbicida atrazina pode atingir frequentemente, valores acima da VMA permitida pela Legislação Portuguesa para águas superficiais (Decreto-Lei nº 236/98) e dos PQA propostos recentemente pela União Europeia (ECC, 2007). Apesar destes factos, está descrito que este herbicida não possui um risco ambiental considerável para o ecossistema aquático. No entanto, Solomon *et al.* (1996) consideram que pode ocorrer prejuízo no ecossistema aquático quando este herbicida fica retido em pequenos reservatórios e/ou ocorre uma repetida libertação para a massa de água. No que respeita aos insecticidas, organofosforado (clorpirifos) e organoclorado (endossulfão sulfato), estes promovem uma acentuada toxicidade aguda e crónica nas espécies do ecossistema aquático. Por outro lado, alguns estudos indicam que a atrazina e o endossulfão podem actuar como desreguladores endócrinos, e por isso promoverem alterações nas taxas de reprodução das populações aquáticas (Oehlmann e Schulte-Oehlmann, 2003; McKinlay *et al.*, 2008).

Os bioensaios foram realizados com *V. fischeri* (bactéria marinha), *D. magna* e *T. platyurus* (crustáceos).

A toxicidade aguda dos pesticidas foi classificada de acordo com a Directiva da União Europeia, que estabelece as categorias de toxicidade dos compostos, para organismos aquáticos, baseadas nos valores de EC<sub>50</sub> (ECC, 1996).

Os objectivos do estudo foram: (i) a avaliação da toxicidade aguda da atrazina, endossulfão sulfato e clorpirifos; (ii) determinação das espécies mais sensíveis na avaliação da toxicidade aguda destes pesticidas no ecossistema em estudo; e (iii) avaliação do seu potencial risco ambiental para este ecossistema.

## IV. 2. Material e Métodos

### IV.2.1. Padrões e Reagentes

Os padrões dos pesticidas atrazina PESTANAL<sup>®</sup> (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>; CAS No. 1912-24-9; grau de pureza 97,4%); endossulfão sulfato PESTANAL<sup>®</sup> (C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S; CAS No. 1031-7-8; grau de pureza 97,7%) e clorpirifos PESTANAL<sup>®</sup> (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS; CAS No. 2921-88-2; grau de pureza 99,2%) foram adquiridos à firma Riedel-de-Häen Laborchemikalien GmbH<sup>®</sup>. Dada a solubilidade em meio aquoso, dos pesticidas, foram previamente preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) as soluções stock de 100 mg L<sup>-1</sup> para a atrazina, de 5 mg L<sup>-1</sup> para o endossulfão sulfato e de 5 µg L<sup>-1</sup> para o clorpirifos, (grau de pureza > 99,0%) adquirido à Merck<sup>®</sup> (Barbosa *et al.*, 2003; Hernando *et al.*, 2007). As concentrações de pesticidas testadas foram preparadas em água ultrapura com uma resistividade > 18 MΩ cm, imediatamente antes do teste. A máxima quantidade de DMSO adicionada aos ensaios foi de 0,01% (v/v). Uma solução de DMSO foi utilizada em todos os ensaios como controlo negativo.

#### IV.2.2. Teste de Inibição de Luminescência com a bactéria *Vibrio fischeri*

Este método foi preconizado conforme o protocolo do “DR LANGE luminescent bacteria test” que segue o procedimento ISO 11348-2 (1998).

A partir das soluções stock de cada um dos pesticidas foram obtidas as seguintes diluições em NaCl a 2%: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100% (v/v). As condições e procedimentos destes ensaios foram descritos na secção material e métodos do capítulo II. A sensibilidade dos organismos foi avaliada através do teste de referência com dicromato de potássio, e encontrava-se de acordo com o protocolo. Foram determinados os valores de EC<sub>50</sub> (%) para cada um dos pesticidas em estudo.

#### IV.2.3. Teste de mortalidade com o crustáceo *Thamnocephalus platyurus*

Este teste teve como objectivo avaliar o efeito, dos três pesticidas, na mortalidade do crustáceo *T. platyurus* após 24 horas de exposição. O teste foi executado conforme o protocolo da MicroBioTests Inc® (Persoone, 1999).

As concentrações nominais de cada um dos pesticidas foram as seguintes: (i) clorpirifos ( $0,4 \times 10^{-3}$ ;  $0,6 \times 10^{-3}$ ;  $0,8 \times 10^{-3}$ ;  $1,0 \times 10^{-3}$ ;  $1,2 \times 10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup>), (ii) endossulfão sulfato (0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 1,20 mg L<sup>-1</sup>), e (iii) atrazina (20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0 mg L<sup>-1</sup>). Nos ensaios foram utilizados como controlo negativo ASTM e ASTM+DMSO. As condições deste ensaio foram descritas na secção material e métodos do capítulo II. Foi realizado um teste de referência com dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) como controlo positivo. A sensibilidade dos organismos testados encontrava-se de acordo com o protocolo. A percentagem de mortalidade entre os organismos teste foi utilizada como parâmetro de avaliação e os valores de EC<sub>50</sub> (%), foram calculados em função do número total dos organismos inicial.

#### IV.2.4. Teste de Inibição de Mobilidade/ Mortalidade com *Daphnia magna*

Este teste tem como objectivo determinar o efeito dos pesticidas em estudo na imobilidade/ mortalidade do crustáceo *D. magna*, após 48 horas de exposição. O teste segue o protocolo descrito na norma ISO 6341 (1996).

Foram usados juvenis com idade inferior a 24h isolados de uma cultura controlada de origem entre o 3º e o 5º nascimento, pertencentes a um clone (clone F) (Baird *et al.*, 1989b). As condições de cultura do crustáceo *D. magna* foram descritas na secção de material e métodos do capítulo II. As concentrações nominais de cada um dos pesticidas em estudo foram: (i) clorpirifos ( $0,5 \times 10^{-3}$ ;  $0,65 \times 10^{-3}$ ;  $0,75 \times 10^{-3}$ ;  $0,80 \times 10^{-3}$ ;  $0,90 \times 10^{-3}$ ;  $1,0 \times 10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup>), (ii) endossulfão sulfato (0,20; 0,40; 0,60; 0,75; 0,80; 0,90; 1,00 mg L<sup>-1</sup>), e (iii) atrazina (30,0; 35,0; 40,0; 60,0; 70,0; 80,0; 100,0 mg L<sup>-1</sup>). Nos ensaios foram utilizados como controlo negativo ASTM e ASTM+DMSO. Estes testes agudos foram efectuados nas mesmas condições e procedimentos descritos na secção material e métodos do capítulo II. A sensibilidade dos organismos foi avaliada através do teste de referência com K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, e encontrava-se de acordo com o protocolo.

Foi calculada a concentração de imobilização/mortalidade de 50% dos organismos usados (EC<sub>50</sub>), em função do número total dos organismos inicial.

#### I.V. 2.5. Análise Estatística

A concentração que promove efeito em 50% dos organismos usados (EC<sub>50</sub> (%)), para os ensaios com *T. platyurus* e *D. magna* foi calculada em função do número total de organismos inicial, utilizando o Método *Probit* (Finney, 1971). No teste de inibição da bioluminescência com *V. fischeri*, os valores de EC<sub>50</sub> (%) foram calculados usando o software LUMISsoft 4™.

### IV. 3. Resultados e Discussão

Os pesticidas testados integram três classes de compostos com diferentes mecanismos de acção. Pela análise da Tabela IV.1. verificamos que o clorpirifos foi o pesticida que maior toxicidade aguda promoveu na bactéria *V. fischeri* (30 min  $EC_{50}=2,84 \text{ mg L}^{-1}$ ). O efeito tóxico induzido por este pesticida foi superior ao determinado por Somasundaram *et al.* (1990). O endossulfão sulfato promoveu um ligeiro efeito tóxico na bactéria (30 min  $EC_{50}=11,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), enquanto a atrazina foi o pesticida menos tóxico para esta espécie (30 min  $EC_5 = 69,4 \text{ mg L}^{-1}$ ). De acordo com as categorias de toxicidade (baseadas nos valores de  $EC_{50}$ ) estabelecidas pela Legislação Europeia (ECC, 1996): “muito tóxico” para organismos aquáticos ( $EC_{50} \leq 1 \text{ mg L}^{-1}$ ), “tóxico” ( $EC_{50}$  entre 1-10  $\text{mg L}^{-1}$ ), e “não tóxico” ( $EC_{50}$  entre 10-100  $\text{mg L}^{-1}$ ), o clorpirifos pode ser classificado como um composto “tóxico” para esta espécie, enquanto a atrazina e o endossulfão sulfato são classificados como compostos “não tóxicos”. O *V. fischeri* foi a espécie mais resistente aos três pesticidas em estudo, o que está de acordo com o descrito por alguns autores (Strachan *et al.*, 2001). No crustáceo *D. magna*, o clorpirifos foi o insecticida mais tóxico, com um valor de 48h  $EC_{50}=0,74 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ . Foram obtidos valores de  $EC_{50}$  similares por outros autores, para este pesticida (Tomlin, 1994, Moore *et al.*, 1998). Para além disso, Zalizniak e Nugegoda (2006) determinaram um valor de 48h  $EC_{50}=0,50 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  para *D. carinata*, o que sugere que os dois organismos apresentam sensibilidades idênticas para este insecticida. Todos os resultados mostraram a elevada sensibilidade dos crustáceos aos pesticidas organofosforados, apresentando valores de  $EC_{50}$  muito baixos para a maioria destes compostos. Este facto pode ser devido ao mecanismo de acção desta classe de químicos que inibem a enzima colinesterase (Fulton e Key, 2001). O endossulfão sulfato, também induz uma elevada toxicidade no crustáceo *D. magna*, resultados similares foram obtidos nos trabalhos de Lemke *et al.* (1980). Por outro lado, Barry *et al.* (1995) obtiveram um valor de 48h  $EC_{50}=0,76 \text{ mg L}^{-1}$  para a espécie *D. carinata*, o que vem confirmar a similaridade de sensibilidades entre estas duas espécies pertencentes ao mesmo *phyla*. No entanto, Wan *et al.* (2005) obtiveram um efeito tóxico agudo em 50% da população de *D. magna* testada, para concentrações de endossulfão

sulfato de 2,12 mg L<sup>-1</sup>, um valor mais elevado do que os descritos anteriormente. De acordo com as categorias tóxicas, anteriormente referidas, o clorpirifos e o endossulfão sulfato, podem ser classificados como “muito tóxicos” para a *D. magna*. No que respeita à atrazina, os resultados indicam que para tempos de exposição curta, este herbicida não é tóxico para a *D. magna*. Latt Phyu *et al.* (2004) determinaram um valor de 48h EC<sub>50</sub>=24,6 mg L<sup>-1</sup> para a *D. carinata* e concluem que esta espécie é mais sensível que a *D. magna*. No entanto, de acordo com as categorias de toxicidade, este herbicida é considerado não tóxico para os dois bioindicadores em questão.

Este é o primeiro estudo sobre o efeito tóxico destes três pesticidas no crustáceo *T. platyurus*. O pesticida que induziu uma maior toxicidade, nesta espécie, foi o clorpirifos, seguido do endossulfão sulfato e da atrazina. Ambos os insecticidas são classificados como “muito tóxicos” para esta espécie. No que respeita, à atrazina esta é classificada como “não tóxica” para esta espécie. O *T. platyurus* apresentou maior sensibilidade, para os dois insecticidas em estudo, do que a *D. magna*. A elevada sensibilidade deste crustáceo é também descrita por vários autores para outras classes de contaminantes como os piretróides (Sánchez-Fortún e Barahona, 2005) e metais pesados (nanopartículas de zinco, cobre e dióxido de titânio; Heinlaan *et al.*, 2008). No entanto, para outros compostos como a prednisona e a dexametasona, o *T. platyurus* é menos sensível que a *D. magna* (DellaGreca *et al.*, 2004).

**Tabela IV.1.** Toxicidade aguda (EC<sub>50</sub>; expresso pela média (95% Intervalos de Confiança) dos pesticidas em estudo (atrazina, endossulfão sulfato e clorpirifos) nas espécies *V. fischeri*, *T. platyurus* e *D. magna*.

	EC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )		
	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	<i>Daphnia magna</i>
	30 min EC <sub>50</sub>	24 h EC <sub>50</sub>	48 h EC <sub>50</sub>
<b>Atrazina</b>	69,4 (68,8-70,0) <sup>a</sup> (n=2)	36,7 (23,2-50,3) <sup>a</sup> (n=3)	35,5 (26,3-44,7) <sup>a</sup> (n=4)
	39,9 (35,4-44,9) <sup>b</sup> > 39,9 <sup>c,*</sup>		
<b>Endossulfão sulfato</b>	11,2 (8,69-13,6) <sup>a</sup> (n=2)	0,58 (0,50-0,66) <sup>a</sup> (n=3)	0,92 (0,87-0,97) <sup>a</sup> (n=4)
			2,12 (1,45-3,99) <sup>c</sup> 0,74 <sup>f*</sup>
<b>Clorpirifos</b>	2,84 (2,52-3,16) <sup>a</sup> (n=2)	0,53x10 <sup>-3</sup> (0,26x10 <sup>-3</sup> -0,79x10 <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup> (n=3)	0,74x10 <sup>-3</sup> (0,69x10 <sup>-3</sup> -0,79x10 <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup> (n=4)
	46,0x10 <sup>-3</sup> d*		0,60x10 <sup>-3</sup> g* 0,17x10 <sup>-3</sup> h*

<sup>a</sup>Resultados obtidos neste trabalho, <sup>b</sup>Tchounwoul *et al.*, 2000, <sup>c</sup>Hernando *et al.*, 2007, <sup>d</sup>Somasundaran *et al.*, 1990, <sup>e</sup>Wan *et al.*, 2005, <sup>f</sup>Lemke, 1980, <sup>g</sup>Moore *et al.*, 1998, <sup>h</sup>Tomlin, 1994. \*95% Intervalo de confiança não descrito.

Para a avaliação do potencial risco ecológico destes pesticidas no ecossistema aquático em estudo (albufeira do Alqueva), relacionamos os valores de toxicidade aguda obtidos no estudo laboratorial com as espécies mais sensíveis e os valores de quantificados na albufeira. Os resultados sugerem que apesar do endossulfão sulfato ser considerado “muito tóxico” em exposições agudas, para os crustáceos usados, os valores quantificados na Albufeira (<0,01-0,27 µg L<sup>-1</sup>) foram aproximadamente 3 500 vezes mais baixos que as concentrações que promovem efeitos tóxicos agudos. A atrazina pode ser tóxica para as espécies aquáticas se apresentar concentrações 600 vezes superiores aos valores quantificados na massa de água (0,01-5,50 µg L<sup>-1</sup>). Assim pode ser considerada como um composto sem risco ambiental agudo para o ecossistema aquático em estudo. No entanto, algumas espécies de plantas podem ser afectadas por concentrações similares ao limite superior do intervalo (Solomon *et al.*, 1996).

O clorpirifos é dos três pesticidas em estudo o que pode constituir um risco para as espécies do ecossistema aquático da albufeira, uma vez que as concentrações quantificadas na massa de água ( $<0,01-0,36 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foram similares aos valores de  $\text{EC}_{50}$  obtidos no estudo laboratorial para a espécie mais sensível.

#### **IV.4. Conclusão**

Os resultados deste estudo confirmam que a resposta tóxica aos pesticidas está fortemente correlacionada com a sensibilidade das espécies. Os insecticidas são mais tóxicos que os herbicidas para as espécies aquáticas utilizadas. Para além disso, os crustáceos são mais sensíveis que as bactérias. No que respeita aos resultados obtidos com os crustáceos, a espécie mais sensível aos insecticidas foi o *T. platyurus*. Estes resultados sugerem que esta espécie pode ser uma boa alternativa aos ensaios de toxicidade aguda com *D. magna*, o que pode justificar o seu uso em programas de avaliação de risco ambiental em ecossistemas aquáticos. Este estudo mostrou que o pesticida mais tóxico foi o clorpirifos e, que as concentrações que promovem toxicidade aguda para as espécies aquáticas são similares às quantificadas na albufeira. Assim, o clorpirifos pode apresentar um impacto ambiental negativo e pode influenciar a densidade populacional de algumas espécies de crustáceos no ecossistema em estudo. Estes factos, indicam a necessidade da realização de estudos crónicos, com concentrações idênticas às encontradas no ecossistema em estudo, para avaliar quais os parâmetros do ciclo de vida das espécies que podem ser influenciados negativamente por este pesticida.



## **CAPÍTULO V**

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS DE CLORPIRIFOS NA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CRUSTÁCEO *DAPHNIA MAGNA***



## Resumo

Nos nossos dias, o clorpirifos é um insecticida muito usado e frequentemente detectado nas águas superficiais. Os objectivos deste estudo foram: (i) avaliar os efeitos crónicos induzidos por este pesticida, no crustáceo *Daphnia magna*, na reprodução e no desenvolvimento embrionário; (ii) analisar quais os *endpoints* crónicos mais sensíveis. As concentrações utilizadas foram 0,01; 0,03; 0,09; 0,18; 0,30  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os *endpoints* usados foram a produção de juvenis por fêmea, a mudança de carapaça, o crescimento e as anomalias no desenvolvimento embrionário. O clorpirifos não promoveu efeito tóxico no crescimento, nem na frequência de mudança de carapaça do crustáceo. No entanto, alterou a taxa de reprodução com um decréscimo significativo do número de juvenis por fêmea a partir da concentração de 0,09  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Para além desse efeito, promoveu ainda o aumento de anomalias embrionárias, que incluíram o aparecimento de ovos abortados em 20 % dos ovos expostos a concentrações de 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Observou-se ainda um aumento de anomalias, em 43% dos juvenis expostos a uma concentração de 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

## V.1. Introdução

Hoje em dia, a maioria dos insecticidas utilizados pertencem às classes de organofosforados, carbamatos e piretróides (Fulton e Key, 2001). Os insecticidas organofosforados substituíram o uso dos organoclorados, uma vez que possuem um comparável espectro de acção e são menos persistentes no ambiente terrestre e aquático (Barron e Woodburn, 1995). O clorpirifos apresenta uma relativa persistência ambiental comparativamente com outros organofosforados, com um tempo de semi-vida entre 29 a 74 dias (Racke, 1993). No entanto, os organofosforados são muito mais tóxicos para os crustáceos, insectos e peixes que outras classes de insecticidas, embora apresentem uma rápida degradação ambiental (Barron e Woodburn, 1995; Chambers *et al.*, 2001).

A toxicidade directa do clorpirifos é devida à sua activação metabólica originando um metabolito que se liga de forma irreversível às enzimas da junção neural, promovendo a sua inactivação, e estimulando de um modo contínuo o sistema nervoso periférico (Klaassen, 2001).

Os crustáceos de água doce, com particular referência à *D. magna*, tornaram-se modelos muito usados em bioensaios de avaliação toxicológica, quer devido à necessidade de desenvolvimento de ensaios ecotoxicológicos em modelos não vertebrados para avaliação do risco ecológico de poluentes, quer devido à sua utilização na determinação de critérios de qualidade de água para consumo (Khangarot e Das, 2009).

O sucesso reprodutivo, que depende da produção e mortalidade dos ovos, é o principal parâmetro de avaliação nos ensaios crónicos com *D. magna*. Baird *et al.* (1991) mostraram que para uma variedade de tóxicos os embriões apresentam uma maior sensibilidade que as formas juvenis. No entanto, até agora, só alguns estudos foram realizados recorrendo à avaliação das várias fases de desenvolvimento embrionário para determinar o efeito tóxico de poluentes ambientais (Abe *et al.*, 2000; Kast-Hutcheson *et al.*, 2001; LeBlanc *et al.*, 2000). Para além disso, estes testes são menos dispendiosos e morosos que os ensaios de exposição crónica (Dave, 1993; Sobral *et al.*, 2001).

Os objectivos deste estudo foram: (i) avaliar os efeitos crónicos induzidos pelo clorpirifos, no crustáceo *D. magna*; (ii) analisar quais os parâmetros de avaliação mais sensíveis.

## V. 2. Material e Métodos

### V.2.1. Padrões e Reagentes

O padrão do pesticida clorpirifos PESTANAL<sup>®</sup> foi adquirido à firma Riedel-de-Häen Laborchemikalien GmbH<sup>®</sup>. A solução “stock” do pesticida foi previamente preparada DMSO (grau de pureza >99,0%) adquirido à Merck<sup>®</sup> (Barbosa *et al.*, 2003; Hernando *et al.*, 2007). As concentrações nominais do pesticida foram preparadas em água ultrapura com uma resistividade >18 MΩ cm, imediatamente antes do teste. A máxima quantidade de DMSO usada nos ensaios foi de 0,01% (v/v). As soluções de DMSO e de ASTM e DMSO foram utilizadas como controlo negativo.

### V.2.2. Cultura de *Daphnia magna*

As condições de manutenção da cultura do crustáceo *D. magna* foram descritas na secção de material e métodos do capítulo II.

Os ensaios crónicos foram realizados com juvenis da 3<sup>a</sup> geração e de idade inferior a 24 horas.

Os ovos de *D. magna*, utilizados no teste de exposição directa ao pesticida foram retirados de fêmeas da cultura laboratorial, provenientes de ninhadas entre a 3<sup>o</sup> e a 5<sup>o</sup> geração.

### V.2.3. Teste de reprodução: exposição materna ao clorpirifos

Para avaliar os efeitos do clorpirifos na reprodução e no crescimento do crustáceo *D. magna* os testes foram realizados de acordo com o protocolo da OCDE 211 (1998). As concentrações de clorpirifos utilizadas neste ensaio foram determinadas a partir do valor de 48h-EC<sub>50</sub> obtido no ensaio agudo (capítulo IV).

Os juvenis foram mantidos individualmente, num volume de 50 ml de ASTM, de ASTM e DMSO e das concentrações nominais de clorpirifos (0,01; 0,03; 0,09; 0,18; 0,30 µg L<sup>-1</sup>). Foram utilizadas dez réplicas por grupo de tratamento com um organismo por réplica. As *Daphnias* foram alimentadas diariamente com *Pseudokirchneriella subcapitata* numa densidade de 3,0x10<sup>5</sup> cel mL<sup>-1</sup> *Daphnia*<sup>-1</sup> (equivalente a 2,65 mg C mL<sup>-1</sup>) e com 4 mL de aditivo orgânico (*Ascomyllum nodosum*) (Baird *et al.*, 1989a). Os animais foram transferidos para meio novo de dois em dois dias. Durante o teste foram controlados parâmetros físico-químicos: temperatura, pH, oxigénio dissolvido e condutividade. Não houve necessidade de fazer nenhuma correcção desses parâmetros.

O teste de referência com o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) foi realizado como controlo positivo. O valor de EC<sub>50</sub> às 24 horas encontrava-se dentro do intervalo de valores (0,6 – 1,7 mg L<sup>-1</sup>) descritos no protocolo.

A maturação dos organismos foi determinada pela frequência de mudança de carapaça e pelo tempo da subida da primeira ninhada para o marsúpio da progenitora. A frequência da mudança de carapaça foi avaliada diariamente e determinada pela média do número total de mudas durante o ensaio. A taxa de reprodução foi estimada pela média do número total de juvenis viáveis produzidos por fêmea. As anomalias no desenvolvimento embrionário foram avaliadas pela observação microscópica de malformações no desenvolvimento dos juvenis produzidos por cada fêmea.

#### V.2.4. Exposição de ovos de *Daphnia magna* ao clorpirifos

Foram isoladas da cultura fêmeas adultas de *D. magna*, logo após libertarem a segunda geração de juvenis, e observadas frequentemente até a passagem dos ovos (que iriam originar a terceira geração) do ovário para o marsúpio. Este evento é considerado como o tempo zero no desenvolvimento embrionário. Oito horas após a subida dos ovos para o marsúpio, as fêmeas, foram transferidas para uma placa e com a ajuda de um microscópio, os ovos foram removidos, recorrendo a uma pipeta de vidro que permitiu a introdução de ASTM para o marsúpio, o que criou uma ligeira pressão resultante do fluxo de entrada do líquido, fazendo com que os ovos fossem transferidos do marsúpio para a placa celular que continha meio de cultura (ASTM) sem os danificar. Em seguida os ovos foram lavados com o meio de cultura e colocados em microplacas com 24 cavidades contendo 1 ml de ASTM, de solvente ou das respectivas concentrações de clorpirifos (0,01; 0,03; 0,09; 0,18; 0,30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Foram realizadas doze réplicas por tratamento. Os ovos foram incubados a uma temperatura constante ( $20 \pm 1$  °C) com um fotoperíodo de 16 horas dia: 8 horas noite. O desenvolvimento embrionário foi observado às 24, 48 e 96 horas. Para a análise da toxicidade embrionária seguimos as seis fases de desenvolvimento embrionário descritas por LeBlanc *et al.* (2000). A primeira e a segunda fase de desenvolvimento embrionário integram o período de gastrulação, a partir da terceira fase inicia-se o período da organogénese.

#### V.2.5. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de homogeneidade de variâncias através do teste de *Kolmogorov-Smirnov* (Sokal e Rohlf, 1995) e, quando possível, sujeitos a análise de variância unifactorial (One-Way ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla com o controlo pelo método de *Dunnnett's* ( $p < 0,05$ ) (Zar, 1996). Os dados que não satisfaziam os requisitos de homogeneidade de variâncias foram analisados pelo teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis on Ranks*.

Quando diferenças entre tratamentos foram encontradas utilizou-se um teste *post-hoc* de comparações múltiplas com o controlo pelo método de *Dunnett's* ( $p < 0,05$ ) (Zar, 1996). Esta análise foi realizada a partir do programa estatístico STATISTICA 6.0 (2001).

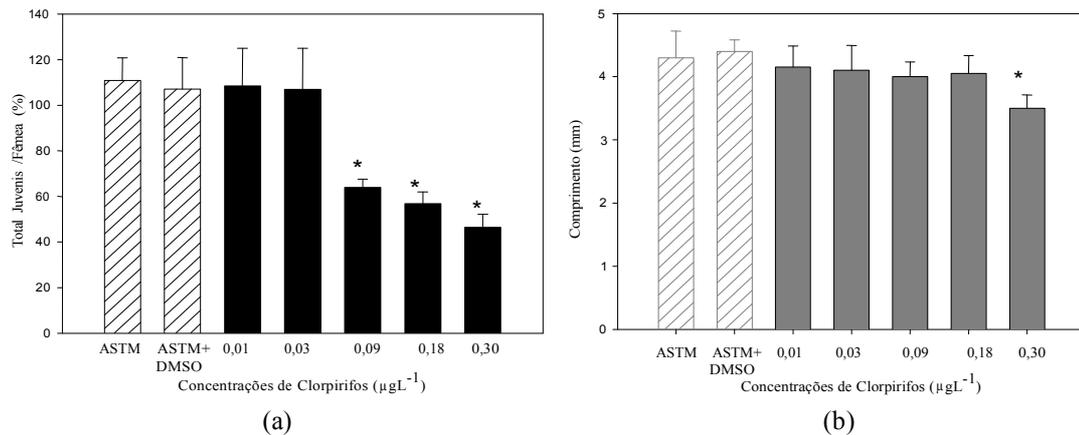
### V. 3. Resultados e Discussão

No que respeita aos efeitos do pesticida no processo de reprodução do crustáceo observou-se que promoveu um decréscimo da produção de juvenis acima da concentração de  $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $F_{6,63}=41,13$ ;  $p < 0,001$ ) (Fig. V.1a). A sobrevivência das *Daphnias* adultas foi de 100%. Não se observaram juvenis mortos nem ovos abortados.

No final do teste, as *Daphnias* foram medidas e o seu tamanho comparado. A exposição a concentrações de  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  promoveu uma diminuição do tamanho das *Daphnias* ( $F_{6,63}=5,90$ ;  $p=0,0006$ ) (Fig. V.1b). A diminuição do tamanho dos adultos não influenciou o número de ninhadas, nem o tempo do primeiro nascimento quando comparado com o controlo.

A mudança de carapaça foi avaliada diariamente e não houve qualquer alteração da sua frequência entre tratamentos. Não foram observados machos em nenhuma das ninhadas.

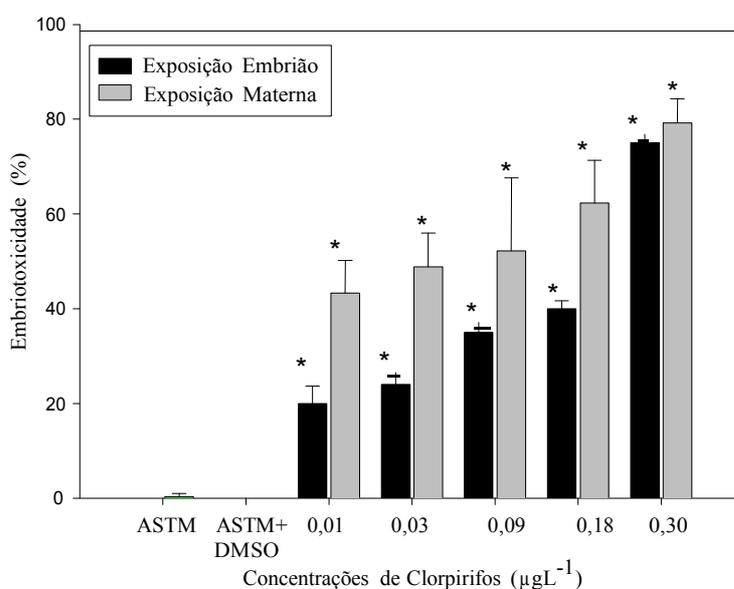
Os resultados obtidos estão em concordância com outros estudos. Assim, a literatura refere uma diminuição da produção do número de juvenis por fêmea para exposições a concentrações de clorpirifos entre  $0,005$  e  $0,500 \mu\text{g L}^{-1}$  (Naddy *et al.*, 2000; Zalizniak e Nugegoda, 2006).



**Figura V.1. (a)** Número total de juvenis produzidos por fêmea; **(b)** comprimento médio dos organismos (média±desvio padrão; n=10). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnnett's*,  $p<0,05$ ).

A toxicidade embrionária induzida pelo clorpirifos foi avaliada através de dois desenhos experimentais: (i) a exposição das progenitoras ao pesticida; e (ii) a exposição directa dos ovos. A exposição materna promoveu um aumento de anomalias de 42% em relação ao controlo, na concentração de 0,01 µg L<sup>-1</sup> ( $F_{6,63}=83,44$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. V.2). Os efeitos embrionários induzidos pelo clorpirifos através da progenitora incluíram: segunda antena pouco desenvolvida (Fig. V.3g), cauda curvada (Fig. V.3e) e cauda flectida para fora (Fig. V.3f). Estes efeitos são todos resultantes de alterações que ocorrem nas últimas fases de desenvolvimento embrionário. Não se observou o aparecimento de ovos abortados.

A exposição directa ao clorpirifos através do ensaio *in vitro* induziu um aumento significativo das anomalias observadas em todas as concentrações testadas, com um valor de anomalias de 20% em relação ao controle para a concentração de 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $F_{6,75}=15,34$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. V.2). Os efeitos tóxicos observados incluíram: (i) embriões que permaneceram na fase dois de desenvolvimento (período de gastrulação) (Fig. V.3b); (ii) alguns embriões apresentaram um desenvolvimento anormal sem uma boa diferenciação do olho, da segunda antena e da cauda, permanecendo na fase três do desenvolvimento embrionário (Fig. V.3c); (iii) outros embriões apresentaram anomalias nas últimas fases de desenvolvimento, nomeadamente alterações na cauda e na antena (Fig. V.3d).

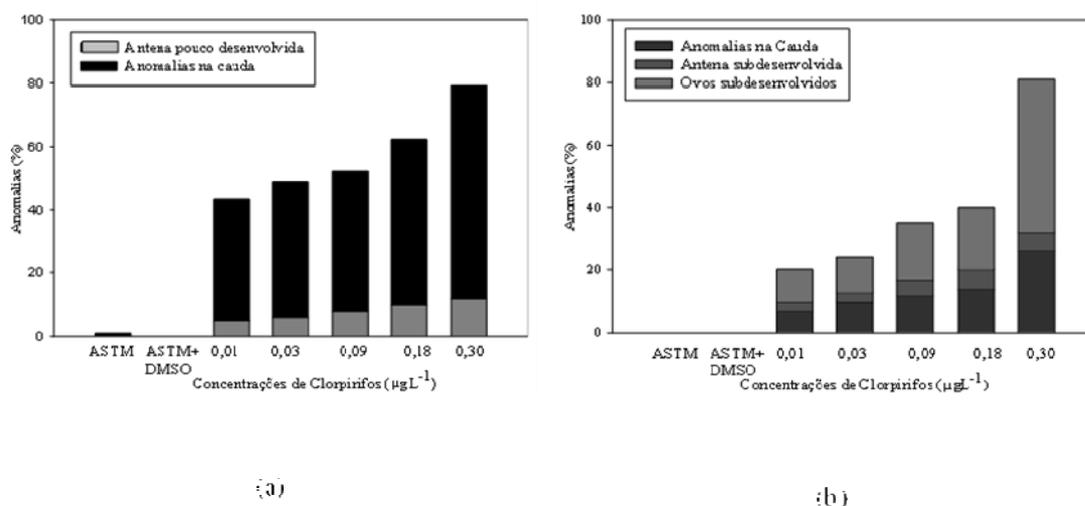


**Figura V.2.** Toxicidade embrionária resultante da exposição materna e directa, ao clorpirifos (média $\pm$ desvio padrão;  $n=12$ ). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p<0,05$ ).



**Figura V.3 (a-g)** Fotografia por microscópio óptico, das anomalias de desenvolvimento resultantes da exposição directa (b, c, d) e materna (e, f, g) ao clorpirifos: **(a)** juvenil normal (controlo); **(b)** embrião que permaneceu na fase de gastrulação embrionária; **(c)** embrião na fase 3 de desenvolvimento; **(d)** juvenil com anomalias na carapaça, cauda e segunda antena; **(e, f, g)** juvenis com alterações morfológicas na cauda, antena e carapaça, (setas).

O perfil de anomalias no desenvolvimento embrionário foi diferente nos dois ensaios. Assim, a exposição materna ao clorpirifos induziu o aparecimento de anomalias nas últimas fases de desenvolvimento, com uma maior incidência de anomalias na cauda (Fig. V.4a). Na exposição directa dos ovos, a percentagem de embriões que permaneceram nas primeiras fases de desenvolvimento aumentou com a concentração de clorpirifos e foi maior que a percentagem de anomalias observadas nas últimas fases de desenvolvimento (Fig. V.4b).



**Figura V.4.** Perfil das anomalias embrionárias resultantes: **(a)** exposição materna (media±desvio padrão; n=10); e **(b)** exposição directa (media ± desvio padrão; n=12). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo.

Os resultados mostraram que nas concentrações de 0,01 e 0,03  $\mu\text{g L}^{-1}$  não ocorreu diminuição do número de juvenis. No entanto, 43 e 49%, respectivamente, desses juvenis apresentaram anomalias, principalmente na cauda. Assim, os resultados indicam que mesmo em doses baixas, o clorpirifos pode afectar uma das fases do ciclo de vida de algumas populações de crustáceos, o que é sustentado por estudos laboratoriais (Zalizniak e Nugegoda, 2006) e por estudos de campo (van der Hoeven e Gerritsen, 1997). Alguns estudos sobre a viabilidade dos ovos expostos a diferentes pesticidas mostraram que o desenvolvimento embrionário é uma fase muito sensível nas espécies de crustáceos. Em estudos com embriões de *D. magna*, expostos a 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  de 3,4-dicloroanilina, observou-se um aumento significativo da permanência dos embriões na fase um de desenvolvimento e nenhum dos embriões libertou a membrana externa (Sobral *et al.*, 2001). Mu e LeBlanc (2002b) observaram efeitos tóxicos no desenvolvimento embrionário quando os embriões de *Daphnia* foram expostos ao fungicida fenarimol. A exposição de embriões ao propiconazol induziu o aparecimento de embriões com antenas subdesenvolvidas e caudas com anomalias (Kast-Hutcheson, *et al.*, 2001).

Os resultados deste estudo demonstraram que os embriões se desenvolvem normalmente quando são removidos do marsúpio das mães e incubados em meio de cultura ASTM, com as condições de fotoperíodo e temperatura idênticas às da cultura. De acordo com os resultados o clorpirifos é embriotóxico para a *D. magna*. O efeito no desenvolvimento embrionário é mais severo na exposição directa, onde a percentagem de embriões que permaneceram nas primeiras fases de desenvolvimento aumentou com a concentração.

O valor de 48h-EC<sub>50</sub> determinado para a *D. magna* foi 0,74 µg L<sup>-1</sup> (capítulo IV), o valor de 21d-LOEC para o número de juvenis por *Daphnia* foi de 0,034 µg L<sup>-1</sup> e o valor de 72h-LOEC para a toxicidade embrionária foi de 0,0075 µg L<sup>-1</sup>. Assim, os resultados demonstram que o ensaio *in vitro* foi mais sensível que os ensaios agudos e crónicos. Resultados similares foram descritos para o 4-nonilfenol (Zhang *et al.*, 2003) e para a 3,4-dicloroanilina (Sobral *et al.*, 2001).

As concentrações de clorpirifos utilizadas na avaliação toxicológica crónica, encontram-se na mesma ordem de grandeza dos valores quantificados na albufeira (<0,01-0,36 µg L<sup>-1</sup>), pelo que este pesticida apresenta um risco ecológico severo em exposições crónicas para as populações de crustáceos deste ecossistema aquático. Para além deste facto, o clorpirifos é um dos compostos integrados na lista de substâncias perigosas da Directiva Quadro da Água. Os valores de PQA propostos para o clorpirifos são: (i) CMA de 0,04 µg L<sup>-1</sup>; (ii) MA de 0,1 µg L<sup>-1</sup> (ECC, 2007). Ou seja, de acordo com os resultados obtidos, o limite proposto para a protecção contra exposições crónica é quatro vezes superior à concentração que promove efeitos embrionários na *D. magna*.

#### **V.4. Conclusão**

Os resultados indicam que este insecticida apresenta um impacto ecológico real para o ecossistema aquático da albufeira do Alqueva. Por outro lado, estudos são necessários para clarificar o conhecimento em relação ao mecanismo de acção tóxica do clorpirifos.

O presente estudo demonstrou que o bioensaio *in vitro* com ovos de *D. magna* é muito sensível e que pode tornar-se uma importante ferramenta de avaliação de toxicidade letal e subletal de poluentes ambientais. Os resultados sustentam, por isso, que é importante a padronização do ensaio *in vitro* para um rápido *screening* de poluentes ambientais. Para além disso, os resultados obtidos neste tipo de ensaios devem ser levados em consideração para a determinação de valores limites de exposição a químicos ambientais.

## **CAPÍTULO VI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DO ENDOSSULFÃO SULFATO NA  
REPRODUÇÃO, NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E NA  
DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DO CRUSTÁCEO *DAPHNIA MAGNA***



## Resumo

O endossulfão sulfato é um dos produtos de transformação do endossulfão e é a forma mais frequente de contaminação nas águas superficiais. O objectivo deste estudo foi avaliar os efeitos induzidos pelo endossulfão sulfato nas alterações do ciclo de vida, desenvolvimento embrionário e diferenciação sexual da *Daphnia magna*. Os parâmetros de avaliação usados foram a frequência da mudança de carapaça, o número de juvenis viáveis, o crescimento, o desenvolvimento de anomalias e o número de machos. As concentrações nominais de endossulfão sulfato encontram-se no intervalo de 9,2 a 458,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O endossulfão sulfato promoveu uma diminuição significativa na produção do número de juvenis por *Daphnia*. Os resultados mostraram uma redução do tamanho das *Daphnia* e uma diminuição da frequência de mudança de carapaça. Para além disso, as concentrações testadas do insecticida promoveram um aumento das anomalias embrionárias. A partir da concentração 91,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  observou-se um aumento da produção de machos. Os resultados sugerem que o endossulfão sulfato interfere com o ciclo de vida e a diferenciação sexual do crustáceo *D. magna*.

## VI.1. Introdução

O endossulfão é um insecticida constituído por uma mistura de isómeros  $\alpha$ -endossulfão e  $\beta$ -endossulfão numa proporção de 2:1-7:3 (Herrmann, 2003). O endossulfão sulfato é o produto da transformação dos dois isómeros (Wan *et al.*, 2005). Na água o endossulfão apresenta um tempo de semi-vida de um a três meses, enquanto o tempo de semi-vida do endossulfão sulfato pode chegar a seis anos (Herrmann, 2003). Este facto, é uma das razões, que explica que o endossulfão sulfato seja a forma de endossulfão mais frequentemente detectada na água (Shivaramaiah *et al.*, 2005), como é confirmado em vários estudos de investigação (Pfeuffer e Rand, 2004; Leong *et al.*, 2007). O endossulfão sulfato induz uma toxicidade aguda similar à do seu precursor nas espécies mais representativas de invertebrados de água doce (Barry *et al.*, 1995; Lemke *et al.*, 1980; Sunderam *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 2005). Vários estudos descrevem a toxicidade crónica induzida pelo endossulfão, em espécies aquáticas de água doce (Fernandez-Casalderrey *et al.*, 1993; Foersom *et al.*, 2001) e de água salgada (Wirth *et al.*, 2001), com alterações na taxa de reprodução, na frequência da mudança de carapaça e no desenvolvimento. No entanto, não existe informação sobre os impactes de concentrações subletais de endossulfão sulfato nos crustáceos. Alguns estudos indicam que ambos os compostos (endossulfão e endossulfão sulfato) apresentam actividade estrogénica em células humanas (Soto *et al.*, 1995) e que o endossulfão antagoniza a acção de androgénios (LeBlanc *et al.*, 2007; McKinlay *et al.*, 2007). No entanto, pouca informação existe sobre os efeitos endócrinos promovidos pelo endossulfão sulfato em invertebrados do ecossistema aquático. Todos estes resultados são imprescindíveis para definir e compreender o real impacte ecológico do endossulfão sulfato no ecossistema aquático, para além de poderem completar o perfil toxicológico da endossulfão.

O objectivo deste estudo foi determinar o efeito de concentrações subletais de endossulfão sulfato no ciclo de vida do crustáceo.

## VI. 2. Material e Métodos

### VI.2.1. Padrões e Reagentes

O padrão do pesticida endossulfão sulfato PESTANAL<sup>®</sup> foi adquirido à firma Riedel-de-Häen Laborchemikalien GmbH<sup>®</sup>. A solução “stock” do pesticida foi previamente preparada em DMSO (grau de pureza > 99,0%) adquirido à Merck<sup>®</sup> (Barbosa *et al.*, 2003; Hernando *et al.*, 2007). As concentrações nominais do pesticida foram preparadas em água ultrapura com uma resistividade > 18 MΩ cm, imediatamente antes do teste. A máxima quantidade de DMSO usada nos ensaios foi de 0,01% (v/v). As soluções de DMSO e de ASTM e DMSO foram utilizadas como controlo negativo.

### VI.2.2. Cultura de *Daphnia magna*

As condições de manutenção da cultura do crustáceo *D. magna* foram descritas na secção de material e métodos do capítulo II.

Os ensaios crónicos foram realizados com juvenis da 3<sup>a</sup> geração e de idade inferior a 24 horas.

Os ovos, de *D. magna*, utilizados no teste de exposição directa ao pesticida foram retirados de fêmeas da cultura do laboratório, provenientes de ninhadas entre a 3<sup>o</sup> e a 5<sup>o</sup> geração.

### VI.2.3. Teste de reprodução: exposição materna ao endossulfão sulfato

Para avaliar os efeitos do endossulfão sulfato na reprodução e no crescimento do crustáceo *D. magna* os testes foram realizados de acordo com o protocolo da OCDE 211 (1998). As concentrações de endossulfão sulfato utilizadas neste ensaio foram determinadas a partir do valor de 48h-EC<sub>50</sub> obtido no ensaio agudo (capítulo IV).

Os juvenis foram expostos a ASTM, ASTM e DMSO e às concentrações nominais de endossulfão sulfato (9,2; 45,8; 91,7; 229,3; 458,7 µg L<sup>-1</sup>). As condições do ensaio, os procedimentos e os parâmetros de avaliação usados foram idênticos aos descritos no ensaio crônico do capítulo V.

### VI.2.4. Diferenciação sexual

Para avaliar os efeitos do endossulfão sulfato na diferenciação sexual do crustáceo *D. magna*, foram realizados dois grupos de experiências de acordo com o protocolo da OCDE 211 (1998). As concentrações do solvente e do pesticida, assim como, as condições de ensaio são idênticas às do teste de reprodução. Todos os juvenis produzidos foram examinados ao microscópio para a determinação do seu sexo. As principais diferenças entre machos e fêmeas encontram-se representadas na Fig. V.1.) (Olmstead e LeBlanc, 2000). A diferenciação sexual foi avaliada através da razão de sexo (número de machos/número total de juvenis).



**Figura VI.1.** Macho pertencente à espécie *D. magna*. As setas indicam as principais diferenças entre os dois sexos. Nos machos o bico encontra-se cortado; apresenta pêlos abaixo da cabeça; a primeira antena está muito desenvolvida; não apresenta o gancho que protege os ovos no marsúpio.

#### VI.2.5. Exposição de ovos de *Daphnia magna* ao endossulfão sulfato

Fêmeas adultas de *D. magna*, que acabaram de libertar a segunda geração de juvenis, foram isoladas da cultura e observadas frequentemente até a passagem dos ovos (que iriam originar a terceira geração) do ovário para o marsúpio. Este evento é considerado como o tempo zero no desenvolvimento embrionário. As concentrações de pesticida utilizados são as mesmas que no teste de reprodução e também se realizou um controlo negativo com ASTM+DMSO. As condições, procedimentos do ensaio e *endpoints* usados do ensaio foram descritos na secção material e métodos do capítulo V.

#### VI. 2.6. Análise Estatística

A análise estatística dos efeitos tóxicos no processo de reprodução e no desenvolvimento embrionário foi idêntica à descrita no capítulo V.

Resultados com valores entre 0 e 1, como a razão de sexo, foram transformados utilizando a raiz do quadrado do arco seno, antes do seu tratamento estatístico. O efeito do endossulfão sulfato na produção de juvenis machos, foi avaliada por regressão logística e o EC<sub>50</sub> (concentração de endossulfão sulfato, que promove o aparecimento de 50% de machos na população exposta) foi estimada usando o programa estatístico *R language* (versão 2.6.2.) (R Development Core Team, 2008).

### VI. 3. Resultados e Discussão

No que respeita aos efeitos do pesticida nos parâmetros de reprodução verificou-se que todas as concentrações testadas promoveram uma diminuição significativa da produção do número de juvenis por fêmea ( $F_{5,54}=103,3$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. VI.2a). Para além disso, a maior concentração testada ( $458,7 \mu\text{g L}^{-1}$ ) induziu uma total inibição do processo de reprodução. O endossulfão sulfato aumentou o tempo necessário para a subida da primeira ninhada para o marsúpio da progenitora, a partir da concentração de  $45,8 \mu\text{g L}^{-1}$ . A sobrevivência das progenitoras foi de 100% e não se observaram juvenis mortos nem ovos abortados durante o teste.

Não existem estudos sobre os efeitos tóxicos de concentrações subletais de endossulfão sulfato. No entanto, foram realizados vários estudos com o seu precursor endossulfão. Assim, Sunderam *et al.* (1994) observaram uma diminuição da taxa de reprodução para concentrações de endossulfão de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  na *Ceriodaphnia cf dubai*. Barry *et al.* (1995) observaram uma diminuição da reprodução da *Daphnia carinata* para concentrações de endossulfão de  $320 \mu\text{g L}^{-1}$ .

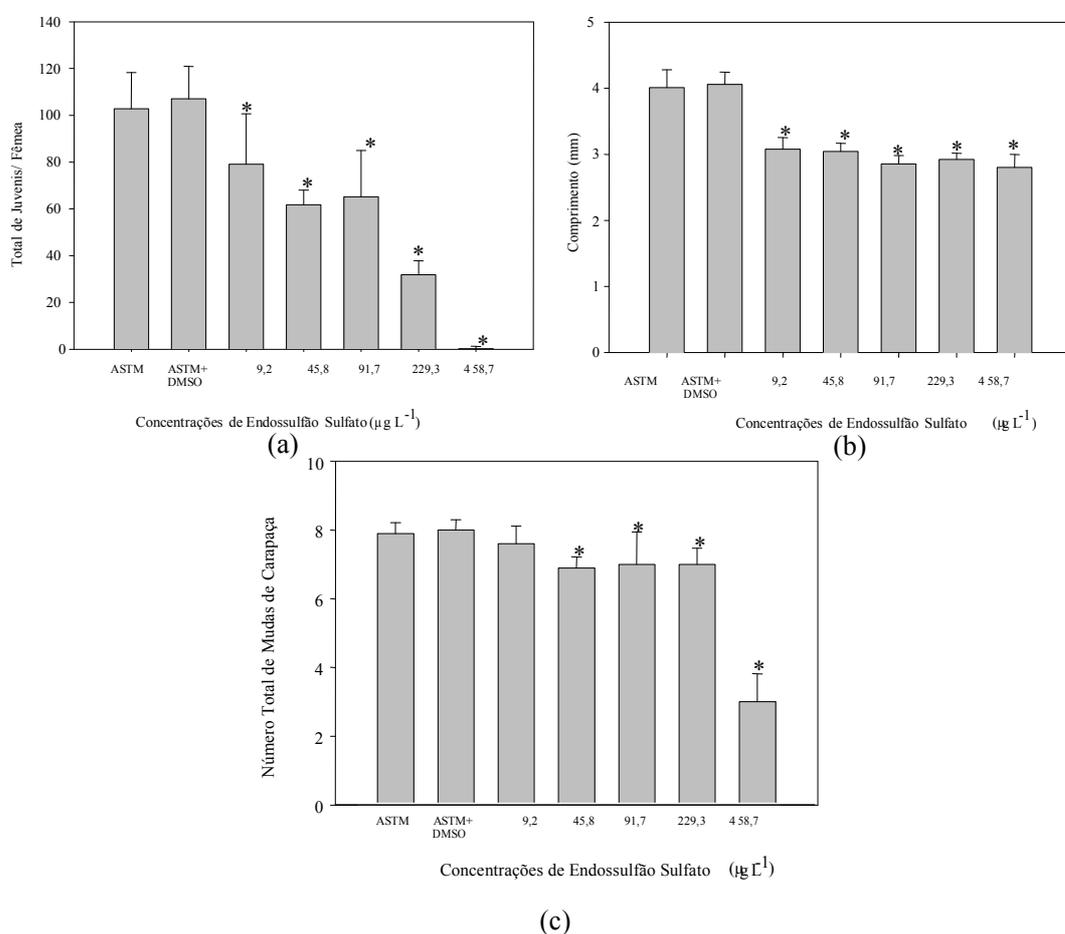
De acordo com os resultados dos vários estudos, e apesar do endossulfão e do endossulfão sulfato apresentarem toxicidades agudas similares, em exposições crônicas a toxicidade induzida pelo endossulfão sulfato ocorreu em menores concentrações que a do endossulfão.

No que respeita às variações no tamanho dos organismos, observou-se que o pesticida promoveu uma diminuição do tamanho dos organismos expostos comparado com o controlo ( $F_{6,63}=97,8$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. VI.2b). A diminuição do tamanho das fêmeas adultas, com a conseqüente diminuição da dimensão do marsúpio, pode influenciar o número de ninhadas por fêmea. Assim, os organismos expostos ao endossulfão eram mais pequenos e libertaram as suas ninhadas mais tardiamente que no grupo controlo.

Os nossos resultados são sustentados por outros estudos que demonstraram que a diminuição do número de juvenis pode ser resultante da diminuição do tamanho das progenitoras que promove uma diminuição do tamanho do marsúpio e por isso limita a acomodação dos ovos (LeBlanc e McLachlan, 1999). No entanto, os resultados indicam que provavelmente este não é o único mecanismo responsável pela redução do número de juvenis, uma vez que a partir da concentração de  $91,7 \mu\text{g L}^{-1}$  não ocorreu diminuição do tamanho das fêmeas e a produção de juvenis continuou a decrescer.

No que respeita ao parâmetro de avaliação frequência de mudança de carapaça, observou-se uma diminuição desta nos organismos teste expostos a concentrações de endossulfão sulfato a partir de  $45,8 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $F_{6,63} = 80,6$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. VI.1c). Assim, as alterações no crescimento e na produção de juvenis foram acompanhadas por uma redução da frequência das mudas. Na concentração de  $458,7 \mu\text{g L}^{-1}$  observou-se uma redução acentuada na frequência de mudança de carapaça, acompanhada por uma total inibição da produção de juvenis. Os resultados indicam que o endossulfão sulfato interfere com o processo de mudança de carapaça como o seu precursor endossulfão (Zou e Fingerman, 1997). No entanto, o endossulfão sulfato afectou negativamente este processo, a partir de concentrações mais baixas do que o seu precursor (Zou e Fingerman, 1997). A redução da frequência da mudança de carapaça e do tamanho dos organismos não apresentou correlação estatística (correlação de Pearson:  $r=0,471$ ;  $n=70$ ;  $p>0,05$ ).

Este facto pode ser fundamentado por estudos que descrevem que o crescimento e a frequência de mudança de carapaça estão coordenados (Chang e O'Connor, 1988), no entanto são dois processos regulados independentemente (LeBlanc e McLachlan, 1999). Na literatura estão referenciados outros compostos que actuam em ambos os processos, sem apresentarem correlação entre eles como o acetato de ciproterona (LeBlanc e McLachlan, 1999), testosterona (Mu e LeBlanc, 2002a) e fenarimol (Mu e LeBlanc, 2002b).



**Figura VI.2.** (a) Número total de juvenis produzidos por fêmea; (b) comprimento médio dos organismos; (c) frequência de mudança de carapaça (média±desvio padrão; n=10). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p < 0,05$ ).

A diferenciação sexual nas *Daphnias* ocorre num período crítico de cerca de 1 hora antes da deposição dos ovos no marsúpio (Zou e Fingerman, 2003). Os ovos formados por partenogénese serão diferenciados em fêmeas ou machos, dependendo das condições ambientais (Rodríguez *et al.*, 2007). Está provado que na *D. magna* a indução de machos é um indicador muito sensível para a detecção de análogos das hormonas juvenóides (Tatarazako *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2005a; Tatarazako e Oda, 2007).

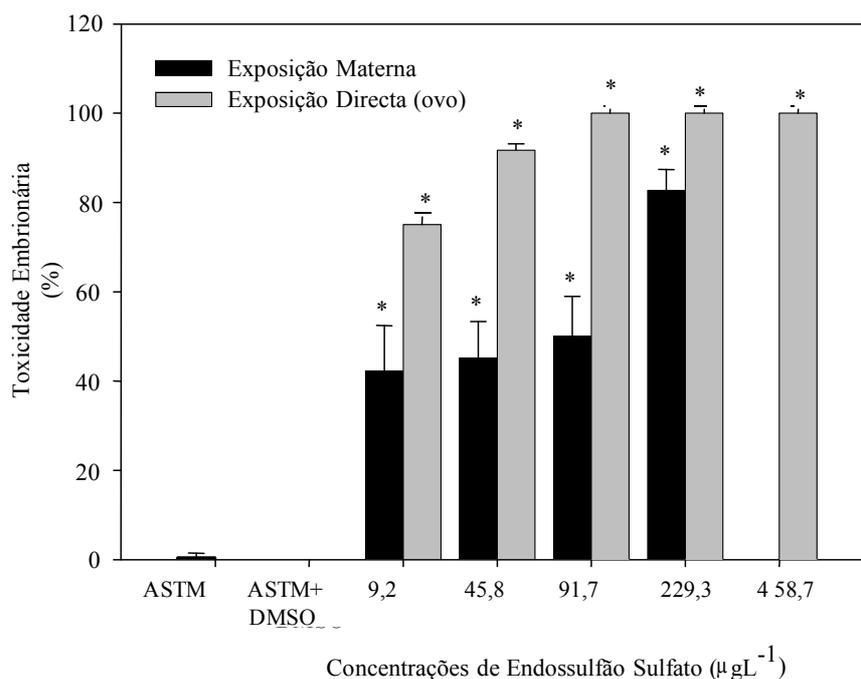
A avaliação da diferenciação sexual foi realizada sem a estimulação prévia da produção de machos. Este facto permitiu eliminar possíveis efeitos aditivos ou antagónicos do químico com possíveis alterações ambientais impostas, que por si só constituem uma causa de produção de machos (Tatarazako *et al.*, 2003). Os resultados mostraram um aumento do aparecimento de machos a partir da concentração de 91,7 µg L<sup>-1</sup> em ambos os grupos de ensaios (Tabela VI.1). A regressão logística do primeiro ensaio permitiu determinar um valor de EC<sub>50</sub> de 435,6±28,1 µg L<sup>-1</sup>. Este resultado foi confirmado pelo segundo grupo de ensaios que permitiu determinar um valor de EC<sub>50</sub> de 453,6±24 µg L<sup>-1</sup>. Não foram observados machos no grupo controlo. Os resultados sugerem que o endossulfão sulfato interfere com a diferenciação sexual nesta espécie. Pelo contrário, alguns estudos indicam que o endossulfão não actua na diferenciação sexual do crustáceo *D. magna* (Zou e Fingerman, 1997; Merrit *et al.*, 1999), o que pode sugerir que o endossulfão sulfato apresenta um mecanismo de acção distinto do seu precursor em alguns processos do ciclo de vida desta espécie.

**Tabela VI.1** – Efeitos do endossulfão sulfato ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) na diferenciação sexual do crustáceo *D. magna*. O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. Ao resultados foram expressos por média $\pm$ desvio padrão (n=10). \* Indica que o declive dos coeficientes de regressão obtidos por regressão logística, foram estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ).

	Endossulfão Sulfato ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
	1º Ensaio				2º Ensaio			
	Total de juvenis/ <i>Daphnia</i>	Machos	Razão de Sexo	Ninhadas que contêm machos (%)	Total de juvenis/ <i>Daphnia</i>	Machos	Razão de Sexo	Ninhadas que contêm machos (%)
ASTM	102,8 $\pm$ 9,9	0	0	0	112,6 $\pm$ 7,4	0	0	0
ASTM+DMSO	107,1 $\pm$ 13,8	0	0	0	107,1 $\pm$ 10,5	0	0	0
9,17	79,1 $\pm$ 21,5	0	0	0	83,2 $\pm$ 15,8	0	0	0
45,8	61,8 $\pm$ 6,3	0	0	0	66,8 $\pm$ 6,5	0	0	0
91,7	65,2 $\pm$ 15,9	1,2 $\pm$ 0,8	0,018*	50	32,8 $\pm$ 3,5	0,6 $\pm$ 0,5	0,018*	50
229,3	31,8 $\pm$ 6,0	1,3 $\pm$ 0,6	0,041*	100	25,1 $\pm$ 6,1	1,8 $\pm$ 0,4	0,071*	100
458,7	-	-	n.d.	-	3,9 $\pm$ 1,8	1,9 $\pm$ 0,3	0,487*	100

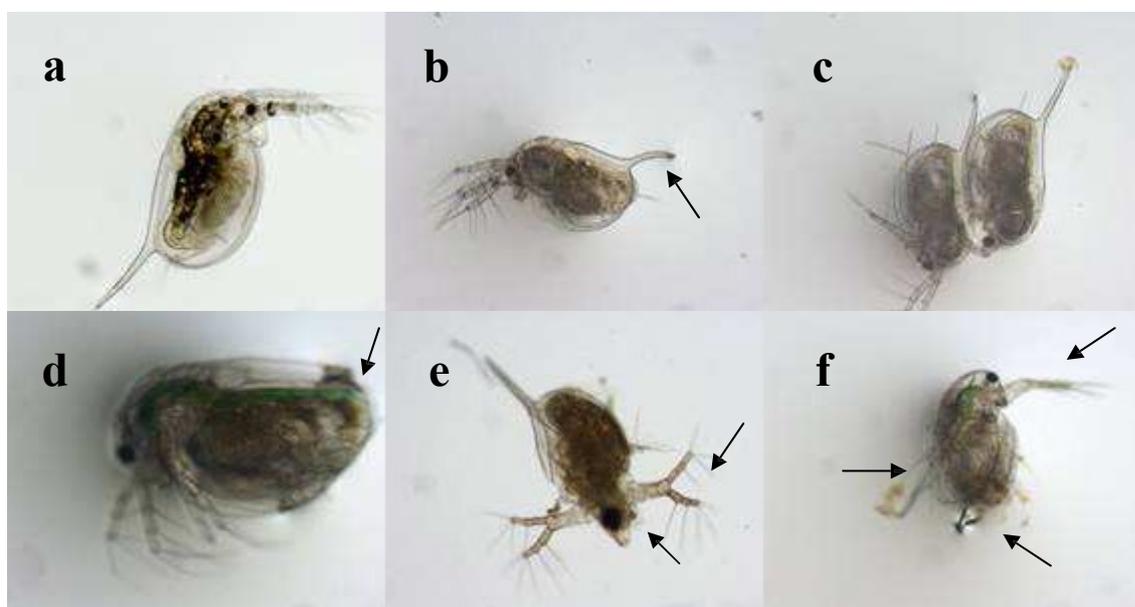
n.d. (não determina do) – não houve produção de juvenis nesta concentração.

Tendo determinado os efeitos do endossulfão sulfato na reprodução, crescimento, frequência de mudança de carapaça e diferenciação sexual, seguidamente analisámos as implicações deste pesticida no desenvolvimento embrionário do crustáceo *D. magna*. De acordo com os nossos resultados o endossulfão sulfato é tóxico para os embriões de *Daphnias*. A embriotoxicidade do composto foi avaliada através de dois grupos de ensaios: a exposição materna (ensaio crónico) e a exposição directa (ensaios com ovos) ao pesticida. Todas as concentrações testadas induziram um aumento do aparecimento de anomalias em ambos os ensaios: exposição materna ( $F_{5,54}=115,5$ ;  $p<0,001$ ) e exposição directa ( $F_{6,77}=46,7$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. VI.3). No entanto, os resultados mostraram que a maior percentagem de anomalias ocorreu na exposição directa ao pesticida, com valores entre 75 a 100% para todas as concentrações testadas.



**Figura VI.3.** Toxicidade embrionária resultante da exposição materna e directa, ao endossulfão sulfato (média±desvio padrão; n=12). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p<0,05$ ).

O perfil de anomalias observadas foi diferente nos dois ensaios. Os efeitos no desenvolvimento embrionário induzidos pelo pesticida através da exposição materna incluíram: segunda antena involuída; cauda inexistente, curvada ou inflectida, e outras alterações morfológicas da carapaça, sem o aparecimento de ovos “abortados” (Fig. VI.4b-f). A exposição directa induziu o aparecimento de ovos na primeira fase de desenvolvimento, embriões com a segunda antena involuída, cauda inexistente ou curvada e outras alterações morfológicas da carapaça (Fig. VI.5b-d). Assim, os efeitos da exposição directa ocorrem em ambos os estádios de desenvolvimento embrionário, quer na gastrulação quer na organogénese.



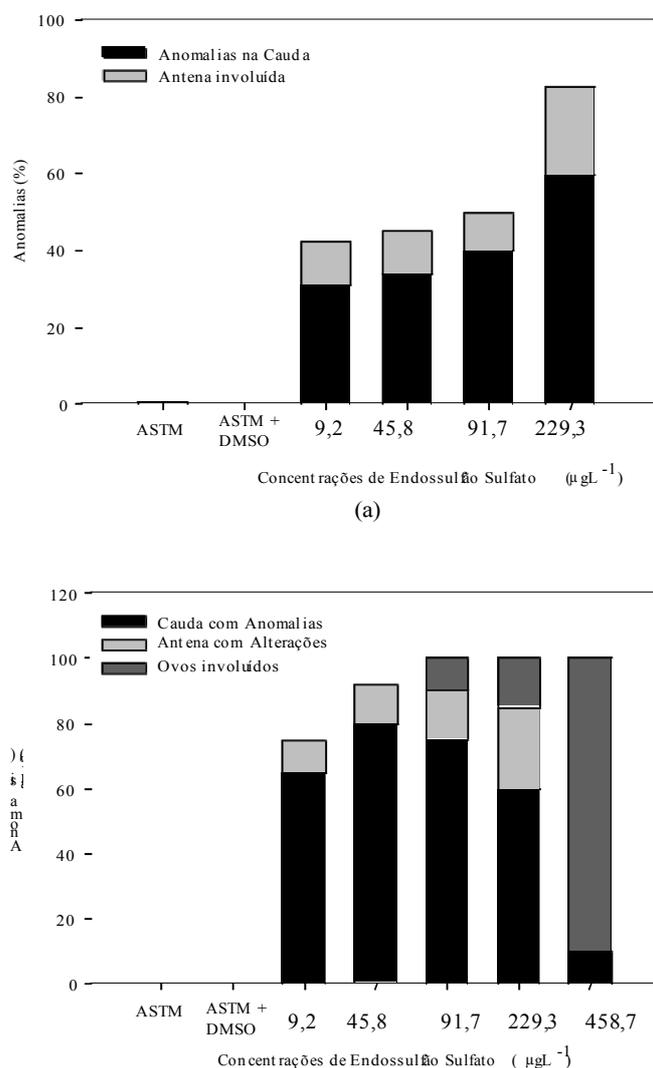
**Figura VI.4. (a-f)** Fotografia por microscópio óptico, de anomalias de desenvolvimento resultantes da exposição materna ao endossulfão sulfato: **(a)** juvenil normal (controlo); **(b)** juvenil com a cauda curvada; **(c)** juvenis com diferentes tamanhos; **(d)** juvenil sem cauda; **(e, f)** juvenis com várias anomalias, na carapaça, na segunda antena e na cauda. Todos os juvenis com anomalias **(b-f)** pertencem à mesma geração que o controlo **(a)**.



**Figura VI.5. (a-d)** Fotografia por microscópio óptico, de anomalias de desenvolvimento resultantes da exposição directa ao endossulfão sulfato: **(a)** juvenil normal (controlo); **(b)** embrião que permaneceu na fase de gastrulação embrionária (fase 2), de notar a presença de um olho (fase 4); **(c)** embrião na fase 3 de desenvolvimento; **(d)** juvenil com anomalias na segunda antena e sem cauda (seta). Todos os juvenis tem a mesma idade que o controlo **(a)**.

A partir da concentração  $91,7 \mu\text{g L}^{-1}$  os resultados indicam que o composto actuou nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário e, que na concentração mais elevada 90% dos ovos permaneceram na fase 2 de desenvolvimento (Fig. VI.6). Os efeitos da exposição materna ao pesticida ocorreram somente na fase de organogénese. A diferença de perfil, em termos de efeitos embriotóxicos, indica que o pesticida foi directamente tóxico para os embriões e, que a progenitora não foi somente o vector de exposição do composto. A embriotoxicidade induzida pelo endossulfão sulfato através da progenitora pode ser o resultado da toxicidade que o pesticida promoveu na progenitora, e/ou da biotransformação materna do endossulfão sulfato num metabolito embriotóxico, como o que foi descrito para o fungicida propiconazole (Kast-Hutcheson *et al.*, 2001).

O aumento das anomalias no desenvolvimento embrionário pode estar correlacionado com a diminuição dos níveis de ecdiesteróides nos embriões (Mu e LeBlanc, 2002a,b; Mu e LeBlanc, 2004). Os efeitos crónicos induzidos, pelo endossulfão sulfato, na *D. magna* são semelhantes aos observados pela exposição a compostos com actividade anti-ecdiesteróide, como o DES (Chang, 1993), testosterona (LeBlanc *et al.*, 2000) e fenarimol (Mu e LeBlanc, 2002b).



**Figura VI. 6.** Perfil das anomalias <sup>(b)</sup> embrionárias resultantes: **(a)** exposição materna (media±desvio padrão; n=10); e **(b)** exposição directa (media ±desvio padrão; n=12) ao endossulfão sulfato. O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo.

As concentrações do endossulfão sulfato na massa de água da albufeira foram muito menores que as concentrações que promoveram efeitos tóxicos crónicos. Este facto pode sugerir que não existe qualquer risco ecológico para as espécies do ecossistema aquático. No entanto, este composto apresenta um elevado factor de bioconcentração que para a *D. magna* é de 3 278 (DeLorenzo *et al.*, 2002). A bioconcentração e a biomagnificação na cadeia trófica, em conjunto, com o efeito promovido por misturas de compostos na massa de água podem aumentar substancialmente o risco ambiental deste composto, na massa de água em estudo. Esta preocupação está evidente nos PQA definidos pela União Europeia para o endossulfão.

#### **VI.4. Conclusão**

Os resultados deste estudo indicam que o endossulfão sulfato actua na taxa de reprodução da *D. magna* por diminuição do número de juvenis, do crescimento e da frequência da mudança de carapaça. Estas alterações são acompanhadas por um aumento das concentração das anomalias nos juvenis e nos embriões.

As concentrações de endossulfão sulfato que promovem efeitos crónicos em vários processos do ciclo de vida do crustáceo, foram mais baixas do que as descritas na literatura para o seu precursor. Para além disso, a redução do crescimento e o aparecimento de machos não foram observados após exposição ao endossulfão. Estes factos sugerem que o endossulfão sulfato apresenta um impacte ecológico superior ao seu precursor, na espécie de invertebrados em estudo.

Os efeitos ecdiesteróides do endossulfão sulfato devem ser avaliados, assim como o seu efeito no sistema juvenóide do crustáceo.



## **CAPÍTULO VII**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DA ATRAZINA NA REPRODUÇÃO,  
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DO  
CRUSTÁCEO *DAPHNIA MAGNA***



## Resumo

A atrazina é um dos herbicidas mais frequentemente detectados na albufeira do Alqueva e que ultrapassou, em vários locais, os PQA propostos pela União Europeia (ECC, 2007). O objectivo deste estudo foi avaliar os efeitos promovidos pela atrazina no ciclo de vida e na diferenciação sexual do crustáceo *Daphnia magna*. Os parâmetros de avaliação foram a frequência de mudança de carapaça, o crescimento, o número de juvenis produzidos por fêmea, as anomalias de desenvolvimento e a produção de machos. As concentrações de atrazina utilizadas no estudo, que foram obtidas a partir dos valores de  $EC_{50}$  determinados no ensaio agudo, encontram-se entre o intervalo de 0,25 e 15,0 mg L<sup>-1</sup>. A atrazina promoveu uma acentuada redução da taxa de reprodução, a partir de 0,5 mg L<sup>-1</sup> e, do crescimento das fêmeas a partir de 2,0 mg L<sup>-1</sup>. O decréscimo do número de juvenis foi acompanhado pelo aumento da percentagem de anomalias. A exposição directa à concentração de 0,25 mg L<sup>-1</sup> induziu o aparecimento de 80% de embriões com anomalias. Para além dos efeitos tóxicos descritos, a partir da concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> observou-se o aparecimento de machos. Os resultados mostraram que o herbicida interfere com o processo de reprodução e que pode actuar no sistema endócrino do crustáceo *D. magna*.

## VII.1. Introdução

A atrazina é uma triazina não-iónica relativamente estável. A sua solubilidade na água ( $33 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $22^\circ\text{C}$ ) e, a adsorção moderada nos solos favorecem uma rápida lixiviação da atrazina dos locais de aplicação para os cursos de água (Huber, 1993). A atrazina pode atingir valores acima do VMA em águas superficiais (Decreto-Lei nº 236/98) e em água para consumo humano (Decreto Lei nº 306/2007, adaptado da Directiva da União Europeia 98/83/EC (ECC, 1998a)). Para além dos factos acima mencionados este herbicida é de difícil remoção da água pelos tratamentos clássicos (Milter *et al.*, 1989).

Devido às suas propriedades físico-químicas a atrazina pode ser acumulada pelo fitoplankton, invertebrados e peixes e promover toxicidade (Huber, 1993; Latt Phyu *et al.*, 2004). Assim, é necessário avaliar os efeitos subletais e irreversíveis deste pesticida.

A sobrevivência e reprodução do crustáceo *D. magna* são fortemente influenciados por poluentes ambientais. Muitos compostos artificiais (por ex. pesticidas) promovem toxicidade nas populações de crustáceos pela diminuição da densidade populacional (Rose *et al.*, 2001), toxicidade embrionária (Mu e LeBlanc, 2002b), e desregulação do sistema endócrino (Oehlmann e Schulte-Oehlmann, 2003).

Alguns estudos descrevem que a atrazina induz efeitos tóxicos no processo de reprodução das populações através da sua acção estrogénica e anti-estrogénica (Villeneuve *et al.*, 1998; Lascombe *et al.*, 2000). Por outro lado, está descrito que este herbicida actua no sistema endócrino dos vertebrados por acção na enzima aromatase (Crisp, 1997).

O objectivo deste estudo foi determinar o efeito de concentrações subletais de atrazina no ciclo de vida do crustáceo *D. magna*, utilizando como *endpoints* o número de juvenis por fêmea, a frequência de mudança de carapaça, o comprimento, as anomalias embrionárias e o aparecimento de machos.

## VII. 2. Material e Métodos

### VII.2.1. Padrões e Reagentes

O padrão do pesticida atrazina PESTANAL<sup>®</sup> foi adquirido à firma Riedel-de-Häen Laborchemikalien GmbH<sup>®</sup>. A solução “stock” do pesticida foi previamente preparada em DMSO (grau de pureza > 99,0%) adquirido à Merck<sup>®</sup> (Barbosa *et al.*, 2003; Hernando *et al.*, 2007). As concentrações nominais do pesticida foram preparadas em água ultrapura com uma resistividade > 18 MΩ cm, imediatamente antes do teste. A máxima quantidade de DMSO usada nos ensaios foi de 0,01% (v/v). As soluções de DMSO e de ASTM e DMSO foram utilizadas em todos os ensaios como controlo negativo.

### VII.2.2. Cultura de *Daphnia magna*

As condições de manutenção da cultura do crustáceo *D. magna* foram descritas na secção de material e métodos do capítulo II.

Os ensaios crónicos foram realizados com juvenis da 3<sup>a</sup> geração e de idade inferior a 24 horas.

Os ovos, de *D. magna*, utilizados no teste de exposição directa ao pesticida foram retirados de fêmeas da cultura do laboratório, provenientes de ninhadas entre a 3<sup>a</sup> e a 5<sup>a</sup> geração.

### VII.2.3. Teste de reprodução: exposição materna

Para avaliar os efeitos da atrazina na reprodução e no crescimento do crustáceo *D. magna* os testes foram realizados de acordo com o protocolo da OCDE 211 (1998). As concentrações de atrazina utilizadas neste ensaio foram determinadas a partir do valor de 48h-EC<sub>50</sub> obtido no ensaio agudo (capítulo IV).

Os juvenis foram expostos a ASTM, a ASTM e DMSO e às concentrações nominais de atrazina (0,25; 0,50; 2,00; 5,00; 15,0 mgL<sup>-1</sup>). As condições, procedimentos do ensaio e *endpoints* utilizados foram idênticos aos descritos no ensaio crônico do capítulo V.

### VII.2.4. Diferenciação sexual

Para avaliar os efeitos da atrazina na diferenciação sexual do crustáceo *D. magna*, foi realizado um grupo de experiências de acordo com o protocolo da OCDE 211 (1998). As concentrações do solvente e do pesticida, assim como, as condições de ensaio foram idênticas às do teste de reprodução. Todos os juvenis produzidos foram examinados ao microscópio para determinação do sexo. As diferenças entre machos e fêmeas foram descritas no capítulo VI.

### VII.2.5. Exposição de ovos de *Daphnia magna* à atrazina

Foram isoladas da cultura fêmeas adultas de *D. magna*, que acabaram de libertar a segunda geração de juvenis e, observadas frequentemente até à passagem dos ovos (que iriam originar a terceira geração) do ovário para o marsúpio. Este evento é considerado como o tempo zero no desenvolvimento embrionário.

As concentrações de pesticida utilizados são as mesmas que no teste de reprodução. As condições e procedimentos do ensaio foram descritos na secção material e métodos do capítulo V.

A percentagem de embriões que exibiram anomalias foi determinada por comparação com os grupos controle. Para análise da toxicidade embrionária seguimos os seis estádios de desenvolvimento embrionários descritos por LeBlanc *et al.* (2000).

#### VII. 2.6. Análise Estatística

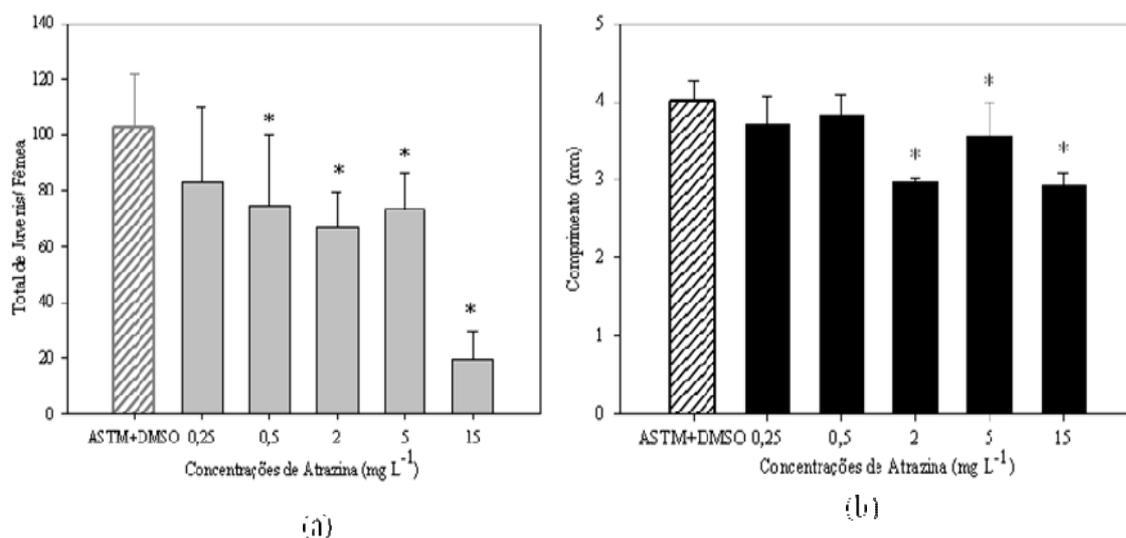
A análise estatística dos efeitos tóxicos no processo de reprodução e no desenvolvimento embrionário foi idêntica à descrita no capítulo V. Os resultados da diferenciação sexual foram analisados de forma similar ao que foi descrito no capítulo VI.

### VII. 3. Resultados e Discussão

No que respeita aos parâmetros de reprodução verificou-se que todas as concentrações do herbicida promoveram decréscimo na produção do número de juvenis, com diferenças significativas do controle a partir da concentração de  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  ( $F_{5,54}=21,44$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. VII.1a). A sobrevivência das fêmeas foi de 100% e não foram observados juvenis mortos nem ovos abortados.

A exposição à atrazina promoveu uma diminuição do tamanho dos crustáceos com diferenças significativas em relação ao controle a partir da concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  ( $F_{5,54}=25,69$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. VII.1b). Não foram observadas diferenças entre tratamentos na frequência de mudança de carapaça. As concentrações de atrazina que promoveram a redução do número de juvenis foram similares às observadas por outros autores (Kaushik *et al.*, 1985; Dodson *et al.*, 1999a).

Assim, a atrazina induziu a um decréscimo do número de juvenis por *Daphnia*, e do tamanho destas sem alterar o processo de mudança de carapaça. A diminuição do tamanho das fêmeas não foi o único responsável pelo decréscimo do número de juvenis, neste ensaio, pois nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg L<sup>-1</sup> a diminuição do número de juvenis não foi acompanhada pela diminuição do tamanho das fêmeas. A não correlação entre o crescimento e a frequência de mudança de carapaça (correlação de Pearson;  $r=0,295$ ;  $n=60$ ;  $p>0,05$ ) já tinha sido observada no ensaio do endossulfão sulfato.



**Figura VII.1. (a)** Número total de juvenis produzidos por fêmea; **(b)** comprimento médio dos organismos (média±desvio padrão;  $n=10$ ). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnnett's*,  $p<0,05$ ).

A avaliação da diferenciação sexual foi realizada sem alterações das condições ambientais de normal desenvolvimento das culturas (como já tinha sido referido no capítulo VI). O aparecimento de machos foi observado a partir da concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> (Tabela VII.1). Na concentração mais elevada obtivemos uma razão de sexo de 0,178. Não foram observados machos nos grupos controlo.

Apesar de estes resultados sugerirem que a atrazina pode afectar a diferenciação sexual nesta espécie aquática, a acção deste herbicida no sistema juvenóide da *D. magna* deve ser analisada com cuidado, uma vez que, os efeitos foram observados para doses elevadas sem significado ambiental.

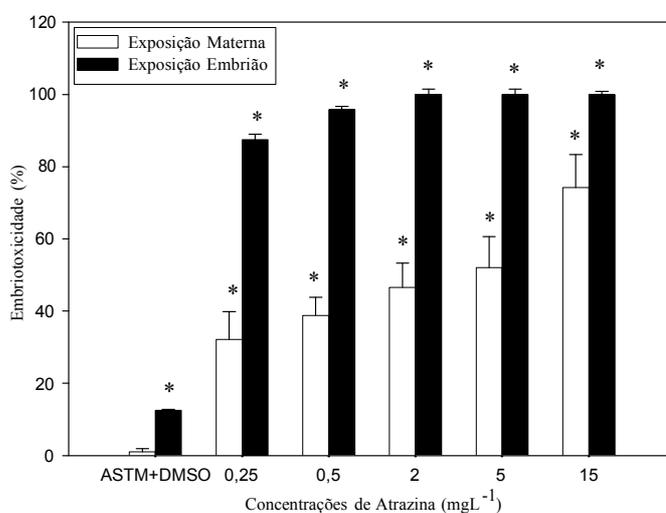
**Tabela VII. 1.** Efeito da atrazina ( $\text{mg L}^{-1}$ ) na diferenciação sexual do crustáceo *D. magna*. O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. Os resultados foram expressos por média $\pm$ desvio padrão ( $n=10$ ). \* Indica que o declive dos coeficientes de regressão obtidos por regressão logística, foi estatisticamente significativo ( $p<0,001$ ).

Concentrações de Atrazina ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Total Juvenis/ <i>Daphnia</i>	Nº Machos	Razão de Sexo	Ninhadas com machos (%)
ASTM	1028	0	0	0
ASTM+DMSO	1000	0	0	0
0,25	833	0	0	0
0,50	747	11	0,015*	30
2,00	668	37	0,055*	30
5,00	733	64	0,087*	70
15,0	196	35	0,178*	30

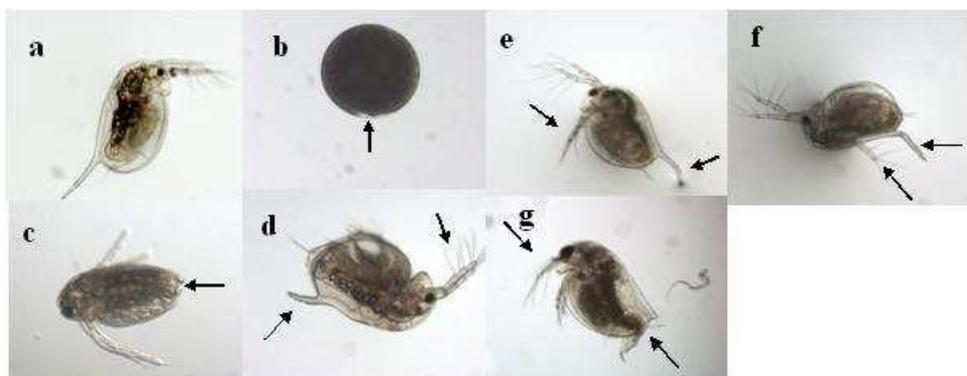
No que respeita aos parâmetros de avaliação utilizados para a análise da toxicidade do herbicida no desenvolvimento embrionário observou-se um aumento das anomalias dos juvenis a partir da concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $F_{5,54}=12,11$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. VII. 2a). As anomalias observadas através da exposição materna incluíram alterações na cauda (curvada, inexistente e flectida para fora) e nas antenas (Fig. VII.3 (e-h)) e não se observou o aparecimento de ovos abortados. A exposição directa ao herbicida promoveu um efeito tóxico mais severo ( $F_{3,140}=12,41$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. VII.2b) com o aparecimento de ovos abortados, para além das anomalias características de alterações nas últimas fases de desenvolvimento embrionário (Fig. VII.3(b-d)). Neste ensaio os embriões expostos às concentrações mais baixas apresentaram uma percentagem de 63% de anomalias em comparação com o controlo.

Este resultado sugere que o efeito tóxico no desenvolvimento embrionário induzido pelo herbicida ocorre para concentrações mais baixas do que as usadas no estudo.

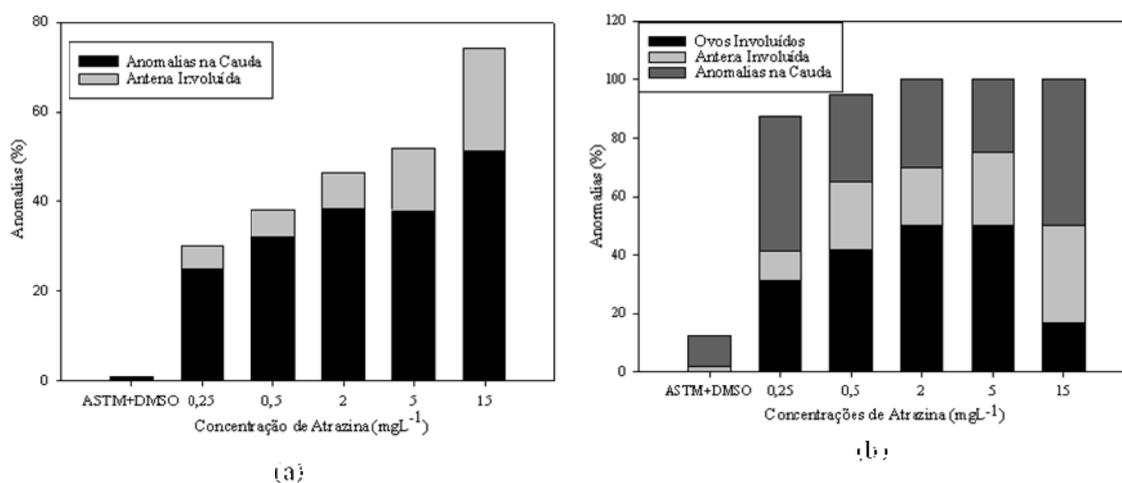
No que respeita, ao perfil de anomalias desenvolvidas, observaram-se diferenças entre a exposição materna e a exposição directa, o que sugere que a progenitora não é somente o vector de exposição do embrião ao pesticida. Estes resultados também foram obtidos para os outros dois pesticidas avaliados (Fig. VII.4).



**Figura VII.2.** Toxicidade embrionária resultante da exposição materna e directa à atrazina (média±desvio padrão; n=12). O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p < 0,05$ ).



**Figura VII.3.** (b-f) Fotografia por microscópio óptico, das anomalias de desenvolvimento resultantes da exposição directa (b-d) e materna (e-g) à atrazina: (a) juvenil normal (controlo); (b) embrião que permaneceu na fase de gastrulação embrionária (fase 2); (c) embrião que permaneceu na 5ª fase de desenvolvimento; (d) embrião com anomalias na cauda e na antena; (e) juvenil com cauda incurvada; (f) juvenil com cauda flectida e antena subdesenvolvida; (g) juvenil sem cauda e com malformações nas antenas.



**Figura VII. 4.** Perfil das anomalias embrionárias resultantes: (a) exposição materna (media  $\pm$  desvio padrão; n=10) e; (b) exposição directa (media  $\pm$  desvio padrão; n=12) à atrazina. O ASTM e o ASTM + DMSO foram usados como controlo negativo.

#### VII.4. Conclusão

Os resultados deste estudo confirmam que, a atrazina actua no sistema reprodutivo do crustáceo *D. magna* pela diminuição do número de juvenis viáveis e do tamanho das fêmeas. A diminuição do número de juvenis é acompanhada pelo aumento de anomalias.

A embriotoxicidade induzida pela atrazina deve ser analisada para concentrações mais baixas, uma vez que qualquer uma das concentrações utilizadas neste estudo promoveu o aparecimento de percentagens muito elevadas de embriotoxicidade.

Apesar de estes resultados sugerirem que a atrazina pode afectar a diferenciação sexual nesta espécie aquática, a acção deste herbicida no sistema juvenóide da *D. magna* deve ser analisada com cuidado, uma vez que os efeitos foram observados para doses muito elevadas, sem significado ambiental.

As concentrações de atrazina avaliadas foram superiores às quantidades detectadas na água superficial da albufeira do Alqueva, o que sugere que não existe nenhum risco ecológico para as populações de invertebrados do ecossistema aquático em estudo. Apesar deste facto, é necessário definir quais as fases de ciclo de vida dos crustáceos mais sensíveis a este herbicida e quais os principais efeitos observados, levando a cabo estudos que possam fornecer informação sobre a toxicidade específica e inerente do composto, bem como a caracterização do seu perfil toxicológico.

## **CAPÍTULO VIII**

**AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE JUVENÓIDE NO SISTEMA ENDÓCRINO  
DO CRUSTÁCEO *DAPHNIA MAGNA*, DOS PESTICIDAS ATRAZINA,  
ENDOSSFULFÃO SULFATO E CLORPIRIFOS**



## Resumo

O crustáceo *Daphnia magna* pertence ao grupo de espécies que apresentam partenogénese cíclica, ou seja, reproduzem-se por partenogénese, ou por reprodução sexuada. Estudos recentes estabeleceram o envolvimento das hormonas juvenóides na alteração do modo de reprodução deste crustáceo de partenogénese para reprodução sexuada, com a consequente produção de machos. Este estudo avaliou a actividade juvenóide e anti-juvenóide dos pesticidas atrazina, endossulfão sulfato e clorpirifos, na *Daphnia magna*. Para avaliar a capacidade juvenóide, *Daphnias* adultas (fêmeas) foram expostas a várias concentrações de pesticidas, usando o número de juvenis produzidos por fêmea e a produção de machos como parâmetros de avaliação. Neste estudo, o fenoxicarbe ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foi utilizado como controlo positivo. A capacidade anti-juvenóide foi avaliada utilizando, um procedimento idêntico ao descrito na literatura, com a adição de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de fenoxicarbe a todas as concentrações de pesticidas usadas. O fenoxicarbe, um análogo das hormonas juvenóides, promoveu a produção de mais de 95% de machos na concentração utilizada. Todos os pesticidas promoveram uma diminuição do número de juvenis por fêmea. O endossulfão sulfato induziu uma fraca actividade juvenóide com um significativo aumento da percentagem de machos com a concentração. Tanto o endossulfão sulfato como a atrazina antagonizaram a actividade juvenóide do fenoxicarbe. No que respeita ao endossulfão sulfato, estes resultados confirmam a hipótese que agonistas juvenóides podem actuar simultaneamente como antagonistas como foi observado noutros sistemas hormonais.

### VIII.1. Introdução

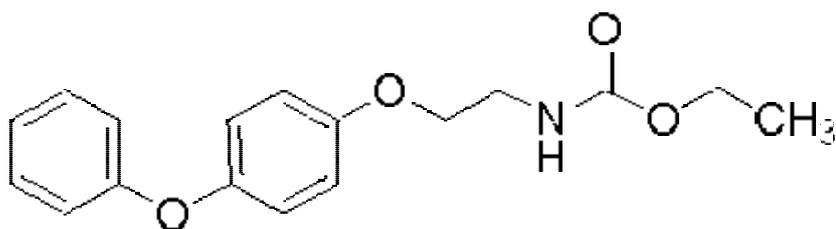
O risco ecológico do uso de pesticida pode estar associado à sua potencial actividade como DEs (Colborn *et al.*, 1993). Até agora, 123 pesticidas estão identificados como possíveis ou confirmados DEs (McKinlay *et al.*, 2008). Vários estudos descrevem efeitos negativos deste tipo de compostos nas espécies selvagens, em alguns casos, induzindo mesmo a diminuição da sua densidade populacional (Hayes *et al.*, 2002; Lavado *et al.*, 2004; Reeder *et al.*, 2005).

Os efeitos da atrazina no sistema endócrino foram estudados em ensaios *in vitro* (Lascombe *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 1998) e em ensaios *in vivo* com vertebrados (Crisp, 1997). Nos ensaios utilizados com invertebrados, os resultados foram contraditórios (Dodson *et al.*, 1999a; Olmstead e LeBlanc, 2003; Stoeckel *et al.*, 2008).

Não existem resultados experimentais, em invertebrados, sobre os efeitos endócrinos promovidos pelo clorpirifos. No entanto, Kang *et al.* (2004) observaram uma actividade anti-androgénica induzida pela presença de metilclorpirifos em ratos.

No que respeita ao endossulfão sulfato, alguns estudos *in vitro* (células humanas) indicam que o endossulfão sulfato apresenta actividade estrogénica (Soto *et al.*, 1995).

O fenoxicarbe (Fig. VIII.1), um insecticida com acção na regulação do crescimento dos artrópodes, foi neste estudo usado como análogo sintético da hormona juvenóide (metilfarnesoato), com base em estudos que demonstraram que mimetiza a acção da hormona juvenil III dos insectos (Dhadialla *et al.*, 1998) e a acção do metilfarnesoato (hormona juvenóide) nos crustáceos (Olmstead e LeBlanc, 2003; Tatarazako *et al.*, 2003). Para além disso, é um composto relativamente estável, de entre os análogos das hormonas juvenóides, (Oda *et al.*, 2005) e, que conjuntamente com o piriproxifeno representam os análogos das hormonas juvenóides que maior número de machos produz em menores concentrações (Tatarazako e Oda, 2007).



**Figura VIII.1.** Estrutura química do fenoxicarbe (adaptado de Tatarazako e Oda, 2007).

Os crustáceos têm sido bastante utilizados na investigação dos mecanismos de desregulação endócrina, devido à sua inclusão em ensaios toxicológicos de avaliação de fármacos e, à sua abundância na natureza (Kashian e Dodson, 2004). Em particular, o crustáceo *D. magna*, tem sido muito utilizado na avaliação toxicológica de poluentes ambientais (Tatarazako e Oda, 2007).

A *D. magna* reproduz-se por partenogénese cíclica, assim é capaz de realizar as duas formas de reprodução assexuada e sexuada (Dodson e Frey, 1991). As fêmeas geneticamente idênticas às suas progenitoras, são produzidas assexuadamente, enquanto as condições ambientais forem favoráveis. Os machos aparecem com alterações ambientais, como mudanças no fotoperíodo ou seja, do ciclo luz: escuro, diminuição do alimento (Hoback e Larsson, 1990) e pela presença de compostos *stressores* (Oda *et al.*, 2005a) que exercem actividade no seu sistema juvenóide, promovendo o aumento dos níveis de metilfarnesoato (hormona responsável pela produção de machos na população). A elevada produção de machos é uma das causas do decréscimo populacional desta espécie (Dodson *et al.*, 1999a; Innes *et al.*, 2000).

Estudos recentes mostraram que a produção de machos nesta espécie é induzida quer pela exposição às hormonas juvenis de insectos e juvenóides de crustáceos quer pela presença de pesticidas designados por análogos das hormonas juvenóides (Olmstead e LeBlanc, 2002, 2003; Tatarazako *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2005a). Até aos nossos dias são conhecidos seis pesticidas que induzem a produção de machos na espécie *D. magna* e, que por isso, são considerados análogos das hormonas juvenóides: fenoxicarbe, metopreno, piriproxifeno, hidropreno, quinopreno e epofenonano (Tatarazako e Oda, 2007).

Neste contexto, o presente estudo teve como objectivos a avaliação da actividade juvenóide e anti-juvenóide dos pesticidas atrazina, endossulfão sulfato e clorpirifos, no sistema endócrino do crustáceo *D. magna*.

Neste estudo utilizaram-se dois *endpoints*: o número de juvenis produzidos por fêmea e a percentagem de produção de machos, para avaliação da toxicidade dos pesticidas isolados e em combinação com o fenoxicarbe. A actividade juvenóide foi determinada pela produção de machos. A actividade anti-juvenóide foi avaliada pela capacidade que os pesticidas apresentaram para reverter o efeito, induzido pelo fenoxicarbe.

## VIII. 2. Material e Métodos

### VIII.2.1. Padrões e Reagentes

Os padrões de atrazina PESTANAL<sup>®</sup>, endossulfão sulfato PESTANAL<sup>®</sup>, clorpirifos PESTANAL<sup>®</sup> e fenoxicarbe PESTANAL<sup>®</sup> (C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>; CAS No. 79127-80-3; grau de pureza 99.2%) foram adquiridos à firma Riedel-de-Häen Laborchemikalien GmbH<sup>®</sup>. As soluções "stock" foram preparadas em DMSO. As soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições das soluções "stock" em água ultra-pura. A máxima quantidade de DMSO usada nos ensaios foi de 0,01% (v/v). Uma solução de ASTM e DMSO foi utilizada em todos os ensaios como controlo negativo e uma solução de fenoxicarbe, numa concentração de 1 µg L<sup>-1</sup>, foi utilizado como controlo positivo para assegurar que as *Daphnias* respondiam apropriadamente.

### VIII.2.2. Teste de reprodução: actividade agonista no sistema juvenóide

Para avaliar os efeitos dos três pesticidas no sistema juvenóide do crustáceo *D. magna*, os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo da OCDE 211 (1998). A avaliação da actividade juvenóide baseou-se na capacidade dos pesticidas estimularem a produção de machos.

Previamente, realizamos um estudo crónico com várias concentrações de fenoxicarbe (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), para avaliar quais as concentrações mais indicadas para serem usadas nos ensaios preconizados.

As *Daphnias* foram expostas ao controlo negativo ASTM e DMSO com uma concentração nominal de 0,001% (v/v) e positivo fenoxicarbe (1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), e às concentrações dos vários pesticidas: atrazina (0,5; 5,0; 15  $\text{mg L}^{-1}$ ); endossulfão sulfato (91,7; 230; 460  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e clorpirifos (0,09; 0,18; 0,30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Os procedimentos e as condições de ensaio foram idênticos aos descritos no capítulo V. A taxa de reprodução foi determinada a partir do número de juvenis produzidos por fêmea. O sexo dos juvenis foi baseado no tamanho da primeira antena (ver capítulo VI) (Olmstead e LeBlanc, 2000).

### VIII.2.3. Teste de reprodução: actividade anti-juvenóide

Neste ensaio avaliou-se a capacidade dos pesticidas de interferirem com a acção do fenoxicarbe no sistema juvenóide do crustáceo. O ensaio seguiu o protocolo da OCDE (1998) com as concentrações das soluções controlo e dos pesticidas idênticas às do ensaio anterior. Neste ensaio, adicionou-se a todas as concentrações de cada um dos pesticidas 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fenoxicarbe. Todas as condições e procedimentos dos ensaios foram semelhantes às dos ensaios anteriores.

#### VIII. 2.4. Análise Estatística

A análise estatística dos efeitos tóxicos no processo de reprodução e no desenvolvimento embrionário foi idêntica à descrita no capítulo V. Os resultados da diferenciação sexual foram analisados de forma similar ao que foi descrito no capítulo VI.

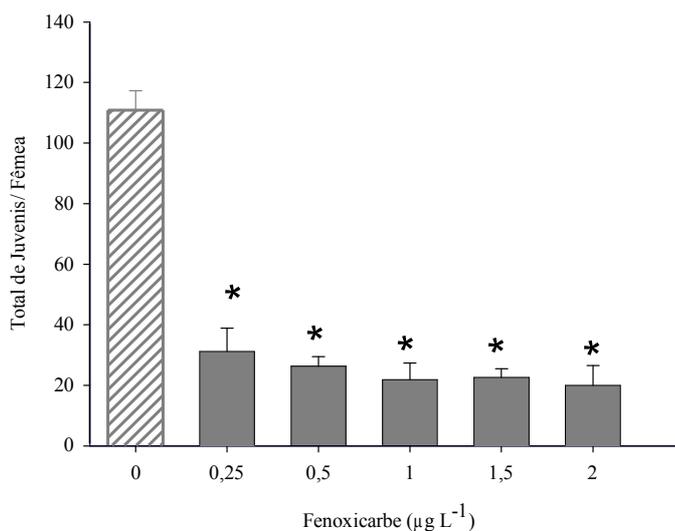
### VIII. 3. Resultados e Discussão

A taxa de reprodução é um dos parâmetros de avaliação, de identificação e caracterização do processo de desregulação. No entanto, recentes estudos descrevem que a produção de machos é estimulada não pelo *stress* químico que causa a toxicidade na reprodução mas, pelo efeito específico de desregulação promovido pelas hormonas juvenóides e pelos seus análogos químicos. Este facto, é confirmado por ensaios que mostram que alguns análogos das hormonas induzem a produção de machos sem a redução do número de juvenis, como o fenoxicarbe nas primeiras 6 horas de exposição e o epofenonane que induz a produção de machos em concentrações mais baixas do que as que promovem o decréscimo do número de juvenis (Tatarazako *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2005a).

No que respeita ao ensaio de reprodução com fenoxicarbe, observou-se uma diminuição significativa da produção de juvenis viáveis por fêmea (Fig. VIII.2). A taxa de reprodução foi reduzida 72% em relação ao controlo, com diferenças significativas para todas as concentrações testadas ( $p=0,002$ ). Nos ensaios realizados não se observaram juvenis mortos nem ovos abortados e todas as fêmeas sobreviveram.

O fenoxicarbe promoveu uma acentuada redução do número de juvenis, em concentrações muito baixas ( $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Estes resultados confirmam o que foi determinado por Hosmer *et al.* (1998) que observaram que a taxa de reprodução parece ser um dos indicadores crónicos mais sensíveis na avaliação da toxicidade do

fenoxicarbe. Este decréscimo muito acentuado da taxa de reprodução após exposição ao fenoxicarbe também foi observado por outros autores (Tatarazako *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2005). Oda *et al.* (2005b) observaram que a exposição a concentrações nominais de fenoxicarbe mais baixas que  $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$  já promovia uma acentuada redução da taxa de reprodução.



**Figura VIII.2.** Número total de juvenis produzidos por fêmea (média±desvio padrão; n=10). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p<0,05$ ).

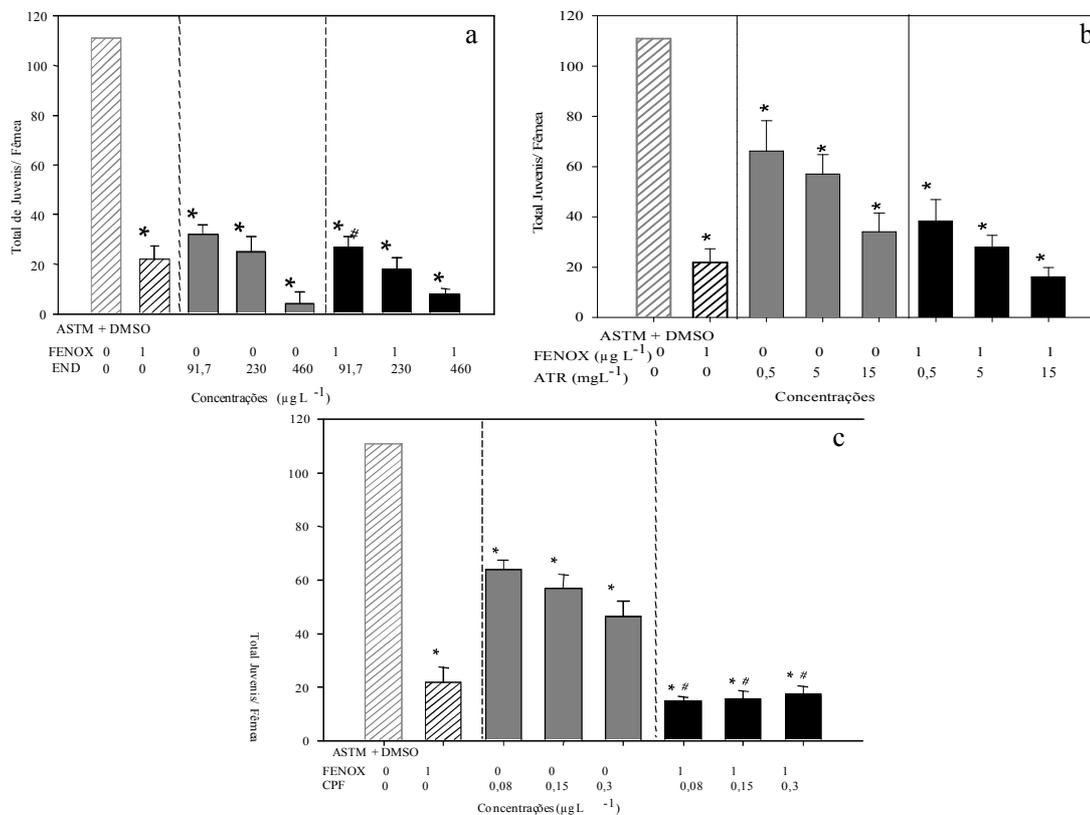
Nos ensaios de reprodução dos pesticidas isolados, os resultados vieram confirmar os resultados obtidos anteriormente. Assim para todos os pesticidas em estudo, houve uma redução significativa da produção do número de juvenis viáveis por fêmea ( $p\leq 0,05$ ) (Fig. VIII. 3 a-c, barras cinzentas). O maior impacto foi observado para o endossulfão sulfato, onde a concentração mais baixa induziu uma redução da taxa de reprodução para cerca de 70%. Para a atrazina e o clorpirifos as concentrações mais baixas promoveram reduções de 46% e 44%, respectivamente. As taxas de reprodução após a co-administração de fenoxicarbe estão representadas na Figura VIII.2 a-c (barras pretas). No caso da atrazina e do clorpirifos a redução do número de juvenis foi mais acentuada na presença de fenoxicarbe, do que com o pesticida isolado ( $p=0,005$ , para todas as comparações de ambos os pesticidas).

No caso do endossulfão sulfato, a redução do número de juvenis também ocorreu, embora não tenha sido tão acentuada, obtendo-se diferenças significativas só para a concentração de  $91,7 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $p=0,044$ ).

Os resultados obtidos para o clorpirifos, no que respeita à taxa de reprodução, vêm confirmar o que foi determinado na avaliação crónica deste insecticida (capítulo V) e que já tinha sido observado por outros autores (Zalisniak e Nugegoda, 2006). A co-exposição do fenoxicarbe induziu uma significativa redução da taxa de reprodução em relação à exposição ao clorpirifos isolado.

Os resultados obtidos para a atrazina confirmaram a acção deste herbicida na diminuição da taxa de reprodução (Kaushik *et al.*, 1985; Dodson *et al.*, 1999a, capítulo VII). A co-administração do fenoxicarbe induziu um decréscimo mais acentuado do número de juvenis em comparação com a exposição ao herbicida isolado. Este facto pode sugerir: (i) o fenoxicarbe potencia a acção da atrazina em misturas; ou (ii) o efeito observado foi devido à acção aditiva dos dois compostos.

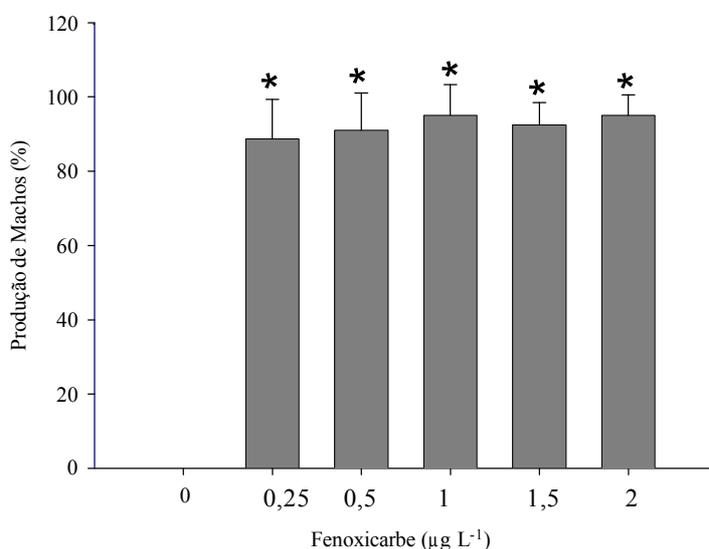
O endossulfão sulfato foi o pesticida que induziu uma redução mais severa na taxa de reprodução do crustáceo *D. magna*. A co-exposição com fenoxicarbe não alterou a tendência de redução da taxa de reprodução pelo pesticida isolado. Para além disso, no estudo de avaliação crónica do endossulfão sulfato (capítulo VI), observou-se que a redução da taxa de reprodução ocorreu em concentrações mais baixas do que as que induziram a produção de machos. Estes factos sugerem que o efeito do endossulfão sulfato no processo da reprodução não ocorreu pela sua acção no sistema juvenóide do crustáceo, como o descrito para o fenoxicarbe durante as primeiras 6 horas de exposição e para o epofenonane (Tatarazako *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2005a).



**Figura VIII. 3.** Número total de juvenis produzidos por fêmea (média ±desvio padrão, n=10) para concentrações de **(a)** endossulfão sulfato (END), **(b)** atrazina (ATR) e **(c)** clorpirifos (CPF) (barras cinzentas) e em mistura com o fenoxicarbe (barras pretas) (FENOX). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \*Diferença significativa em relação ao controlo; # Diferença significativa em relação ao pesticida isolado (Teste de *Dunnett's*,  $p<0,05$ ).

Não foram observados machos no grupo controlo negativo, em qualquer um dos ensaios. A exposição ao fenoxicarbe em paralelo com a redução do número de juvenis induziu a um aumento de produção de machos, para todas as concentrações testadas, atingindo percentagens entre  $88,6\pm 3,6\%$  para a concentração de  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$  e de  $95,0\pm 2,8\%$  para  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. VIII.4.). A regressão logística determinou um valor de  $EC_{50}$  de  $0,19\pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela VIII.1.). Assim, a redução da taxa de reprodução ocorreu simultaneamente com o aumento da produção de machos, atingindo valores de 95%, com 100% de ninhadas a apresentarem machos.

Estes resultados estão de acordo com o estudo de Wang *et al.* (2005), que observaram um valor de 100% de machos para uma concentração de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de fenoxicarbe. A total produção de machos foi também observada por Oda *et al.* (2007) para concentrações ainda mais baixas de fenoxicarbe ( $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Em exposições curtas, foi observado a produção de 100% de machos, no crustáceo *D. magna* de uma estirpe do Instituto Nacional de Estudo Ambientais do Japão, quando expostos a concentrações de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (Oda *et al.*, 2006). O  $\text{EC}_{50}$ , para o fenoxicarbe, obtido neste estudo é mais baixo do que o determinado por Oda *et al.* (2007), para uma estirpe de *D. magna* proveniente da Agencia de Protecção Ambiental dos Estados Unidos ( $\text{EC}_{50}=0,45 \mu\text{g L}^{-1}$ ).



**Figura VIII.4.** Total de machos produzidos (média±desvio padrão; n=10). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnett's*,  $p<0,05$ ).

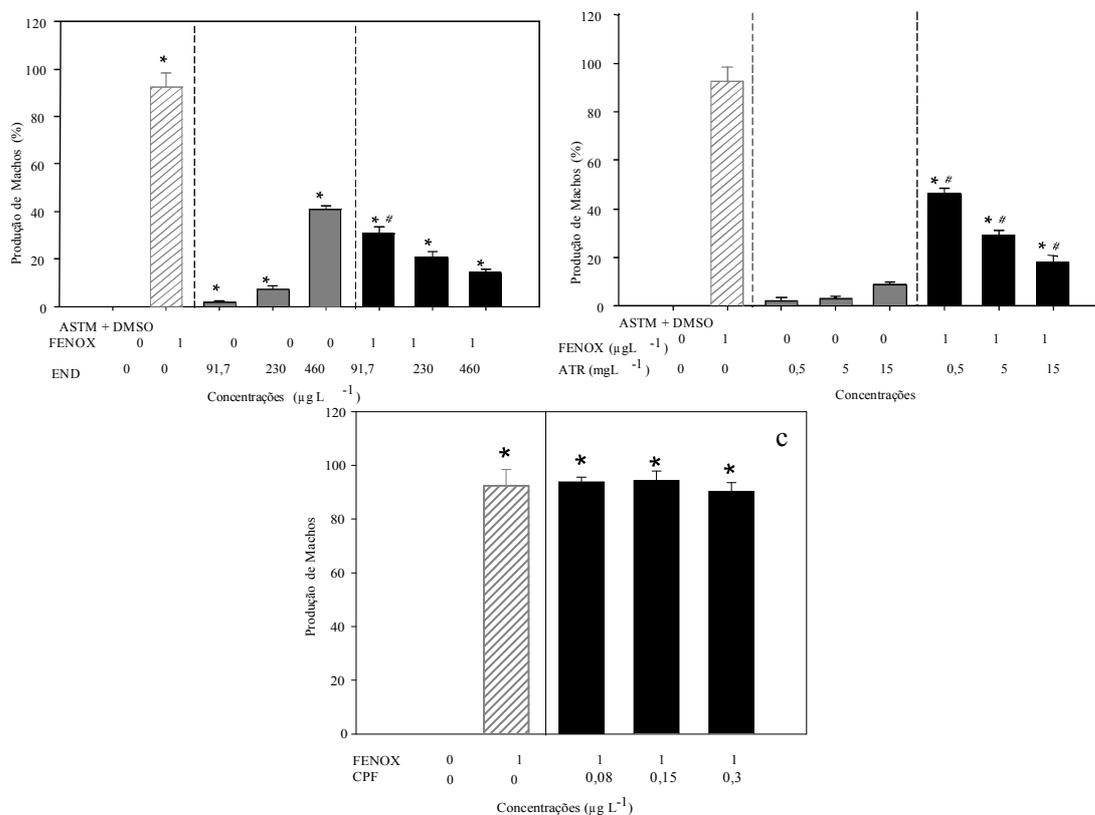
Dos pesticidas avaliados o clorpirifos foi o único que não induziu a produção de machos (Fig. VIII.4c; barras cinzentas), o que sugere que este composto não actua no sistema juvenóide do crustáceo. Assim, apesar de alguns estudos descreverem a actividade anti-androgénica do metilclorpirifos em vertebrados (Kang *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2006), o clorpirifos não apresenta actividade no sistema endócrino deste crustáceo.

Este facto parece similar ao que foi descrito para outros três compostos (bisfenol A, *p*-nonilfenol e 4-*t*-octilfenol) que actuam no sistema endócrino de vertebrados e peixes (Tabata *et al.*, 2003; Ministério do Ambiente do Japão, 2004) mas, não apresentam actividade nas hormonas juvenóides dos crustáceos (Tatarazako *et al.*, 2004).

A atrazina isolada induz uma produção de machos, na mais alta concentração, de  $8,6 \pm 4,3\%$  ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Fig. VIII.4b; barras cinzentas). No que respeita à quantidade de ninhadas que contêm machos situa-se entre os 30 e 70%. A regressão logística confirma o efeito positivo da atrazina na indução de machos, com um declive pequeno mas significativo ( $0,12 \pm 0,03$ ;  $p < 0,001$ ; Tabela VIII.1) e, com um valor muito elevado de  $EC_{50}$  de  $43,9 \pm 9,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . O efeito da atrazina na actividade juvenóide é muito controverso e deve ser analisado com cuidado. Assim Dodson *et al* (1999a) concluíram que concentrações de atrazina entre 5 e  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  aumentam significativamente a produção de machos num clone de *D. pulicaria*. No entanto, Olmstead e LeBlanc (2003) não observaram qualquer efeito, num clone de *D. magna*, para concentrações de atrazina inferiores a  $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Stoeckel *et al.* (2008) avaliaram os efeitos do herbicida em vários tipos de clones de *Daphnias* quer em laboratório quer em condições ambientais e, observaram que só ocorreu a produção de machos nos ensaios com populações naturais de *Daphnias* em condições ambientais, para concentrações superiores a  $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Nos ensaios laboratoriais não se observou a produção de machos para nenhuma das concentrações do herbicida. As diferenças observadas podem ser devidas quer a diferenças genéticas nos vários clones quer a diferenças entre as espécies de algas utilizadas, por cada laboratório, na alimentação das respectivas culturas.

Pelo contrário, os resultados obtidos para o insecticida endossulfão sulfato, mostraram uma clara evidência na relação dose-resposta entre a concentração e a produção de machos (Fig. VIII.5a; barras cinzentas), atingindo um máximo de produção de machos de  $40,8 \pm 3,3\%$ . A regressão logística estabeleceu um valor de  $EC_{50}$  de  $476,0 \pm 30,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela VIII.1.).

Na avaliação da capacidade anti-juvenóide observou-se que o clorpirifos foi o único dos pesticidas que não reduziu a produção de machos induzida pelo fenoxicarbe.



**Figura VIII.5.** Percentagem da produção de machos (média±desvio padrão; n=10), para concentrações de **(a)** endossulfão sulfato (END); **(b)** atrazina (ATR) e **(c)** clorpirifos (CPF) (barras cinzentas) e em mistura com o fenoxicarbe (FENOX) (barras pretas). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo; # Diferença significativa em relação ao pesticida isolado (Teste de *Dunnnett's*,  $p < 0,05$ ).

A atrazina e o endossulfão sulfato reverteram o efeito tóxico do fenoxicarbe, induzindo uma redução significativa da percentagem do número de machos, quando comparado com a concentração de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  do fenoxicarbe isolado (Fig. VIII.5 a-b; barras pretas). A mais baixa concentração de atrazina induziu uma redução de  $52 \pm 7,6\%$  na produção de machos, enquanto a mais alta concentração decresceu a variável para um valor de  $14,8 \pm 6,6\%$ . Estes resultados suportam a hipótese da atrazina actuar no sistema juvenóide do crustáceo *D.magna*.

O endossulfão sulfato reduziu significativamente a produção de machos estimulada pelo fenoxicarbe isolado em  $32\pm 4,2\%$  na concentração de  $91,7 \mu\text{g L}^{-1}$ . Estes resultados sugerem que o endossulfão competiu com o fenoxicarbe pela ocupação parcial dos receptores juvenóides, do que resultou um efeito negativo na activação do receptor. Estes resultados estão de acordo com as observações registadas com o pesticida dieldrina, que pertence à mesma classe de insecticidas (ciclodienos) (Dodson *et al.*, 1999b; Wang *et al.*, 2005). Nestes estudos os autores sugerem que a dieldrina apresenta uma dupla acção agonista/ antagonista e apoiam a hipótese, proposta por Wong *et al.* (1995) e LeBlanc *et al.* (2003) de que, agonistas do sistema juvenóide podem actuar como anti-juvenóides.

**Tabela VIII. 1.** Valores de  $EC_{50}$  (media  $\pm$ desvio padrão; n=10) para a produção de machos, estimados a partir de regressão logística, dos pesticidas endossulfão sulfato, atrazina e do análogo da hormona juvenóide fenoxicarbe, isolados e em mistura.

Pesticida	Fenoxicarbe ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Desvio	$p$	$EC_{50}$
<b>Atrazina</b> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0	$0,12\pm 0,03$	$< 0,001$	$43,9\pm 9,6$
	1	$-0,31\pm 0,02$	$< 0,001$	$2,2\pm 0,2$
<b>Endossulfão Sulfato</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0	$0,012\pm 0,001$	$< 0,001$	$476,0\pm 30,2$
	1	$-0,009\pm 0,001$	$< 0,001$	$90,2\pm 13,6$
<b>Fenoxicarbe</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	-	$43,0\pm 8,6$	$< 0,001$	$0,19\pm 0,01$

#### VIII.4. Conclusão

De entre os pesticidas avaliados o clorpirifos é o único que não actua no sistema juvenóide do crustáceo. No entanto, os resultados deste estudo em conjunto com os resultados da avaliação crónica (capítulo V) mostraram que as concentrações ambientais testadas (isoladas ou em mistura) podem promover um impacte negativo em algumas das populações de crustáceos do ecossistema aquático em estudo.

Os resultados sugerem que o endossulfão sulfato apresenta actividade juvenóide no sistema endócrino do crustáceo *D. magna* e suportam os resultados obtidos nos ensaios crónicos (capítulo VI). O seu efeito pode ser devido à sua acção no receptor juvenóide do crustáceo, pela estimulação dos níveis de metilfarnesoato. Este mecanismo de acção necessita de ser esclarecido.

Em relação à atrazina o seu efeito agonista no sistema juvenóide é muito controverso, não ocorrendo para concentrações ambientalmente detectáveis no ecossistema aquático, no entanto o seu efeito antagonista marcado pode ter repercussões a nível ambiental muito importantes, pois pode reverter o efeito de químicos com um efeito agonista extremamente forte como é o caso do fenoxicarbe.

Deste estudo sobressai ainda a necessidade de serem avaliados os efeitos em conjunto dos poluentes ambientais, para a avaliação dos processos de interacção entre compostos.

## **CAPÍTULO IX**

### **AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ECDIESTERÓIDE, NO SISTEMA ENDÓCRINO DO CRUSTÁCEO *DAPHNIA MAGNA*, DOS PESTICIDAS ATRAZINA E ENDOSSULFÃO SULFATO**



## Resumo

O sistema ecdiesteróide usado por crustáceos e artrópodes é, um sistema de hormonas esteróides polihidroxiladas que regulam processos como a mudança de carapaça e o desenvolvimento embrionário. O objectivo deste estudo foi avaliar a actividade ecdiesteróide dos pesticidas endossulfão sulfato e atrazina, com distintos modos de acção e que actuam no sistema juvenóide do crustáceo *Daphnia magna*. A avaliação da actividade ecdiesteróide foi realizada a partir da exposição das fêmeas e dos ovos a concentrações nominais dos dois pesticidas. O efeito produzido por estes pesticidas isolados foi determinado pela frequência de mudança de carapaça e pelas anomalias embrionárias. Em seguida, avaliamos se os efeitos observados com os pesticidas isolados eram ou não promovidos pela desregulação do sistema endócrino do crustáceo através da co-administração de 20-HE, principal hormona do sistema ecdiesteróide dos crustáceos. Ambos os pesticidas induzem um aumento das anomalias embrionárias. No entanto, só o endossulfão sulfato induziu um atraso no processo da frequência da mudança de carapaça. Os efeitos induzidos pela atrazina não foram revertidos através da co-administração da hormona 20-HE. Pelo contrário, a co-administração de 20-HE permitiu a reversão dos efeitos induzidos pelo endossulfão sulfato, em ambos os processos avaliados (mudança de carapaça e anomalias no desenvolvimento embrionário). Estes resultados sugerem que a atrazina promove a sua toxicidade sem interferir com o sistema ecdiesteróide do crustáceo enquanto, o endossulfão sulfato é um composto com actividade anti-ecdiesteróide na *Daphnia magna*.

## IX.1. Introdução

A eficácia dos pesticidas é reflectida nos elevados níveis de toxicidade aguda em organismos alvo e não-alvo, com efeitos crónicos nomeadamente na redução de taxas de reprodução e no aumento da toxicidade embrionária (LeBlanc, 1997). Recentemente, alguns destes efeitos crónicos foram atribuídos a propriedades de alguns compostos que alteram o sistema endócrino das espécies (Kelce *et al.*, 1995; Oberdorster e Cheek, 2001; Rodríguez *et al.*, 2007).

Poucos estudos existem sobre as propriedades endócrinas dos pesticidas em estudo (os que existem na literatura, foram referidos no capítulo VIII), e não são estudos sobre os seus efeitos no sistema ecdiesteróide da *Daphnia magna*. No que respeita à atrazina, vários estudos, incluindo o da avaliação crónica realizado neste trabalho de investigação (capítulo VII), indicam que este composto promove alterações na fecundidade, pelo decréscimo do número de juvenis, assim como no crescimento (Kaushik *et al.*, 1985; Dodson *et al.*, 1999) e induz o aumento de anomalias em embriões e juvenis (Shcherban, 1972). Em relação ao endossulfão sulfato, não existem estudos sobre a sua acção no sistema ecdiesteróide da *D. magna*. No estudo da avaliação crónica do endossulfão sulfato (capítulo VI), observou-se que este composto induziu a redução do número de juvenis, a diminuição da frequência da mudança da carapaça e o aumento das anomalias em juvenis e embriões. Todos estes efeitos podem ser promovidos por compostos que apresentem actividade anti-ecdiesteróide (LeBlanc, 2007). Na avaliação juvenóide (capítulo VIII) concluiu-se que ambos os pesticidas actuam no sistema juvenóide da *D. magna*, o endossulfão sulfato com maior evidência que a atrazina.

Alguns compostos com actividade anti-ecdiesteróide em crustáceos actuam como inibidores da síntese de ecdiesteróides ou antagonistas dos receptores ecdiesteróides. No entanto, Mu e LeBlanc (2004) mostraram que a hormona juvenóide metilfarnesoato, na *D. magna*, inibe processos que estão sob o controlo positivo dos ecdiesteróides.

Este facto pode sugerir que o aumento dos níveis de metilfarnesoato induzido por análogos juvenóides pode ser responsável pelo aparecimento de efeitos anti-ecdiesteróides no crustáceo.

Os objectivos deste estudo foram (i) avaliar se os efeitos tóxicos promovidos pelos pesticidas, na *D. magna* são devido às suas propriedades anti-ecdiesteróides. Para isso, determinou-se o efeito induzido por estes pesticidas em dois dos processos regulados pelo sistema ecdiesteróide (mudança de carapaça, desenvolvimento de anomalias embrionárias) e, em seguida, avaliou-se a capacidade da hormona 20-HE, administrada exógenamente, de reverter a toxicidade promovida por estes pesticidas.

## **IX. 2. Material e Métodos**

### **IX.2.1. Padrões e Reagentes**

Foram adquiridos, os padrões dos pesticidas atrazina PESTANAL<sup>®</sup>, endossulfão sulfato PESTANAL<sup>®</sup> e 20-HE (C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>7</sub>; CAS No. 5289-74-7; grau de pureza 99,2%) à firma Riedel-de-Häen Laborchemikalien GmbH<sup>®</sup>. As soluções "stock" foram preparadas em DMSO (Barbosa *et al.*, 2003; Hernando *et al.*, 2007) As soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições das soluções "stock" em água ultra pura. A máxima quantidade de DMSO usada nos ensaios foi de 0,01% (v/v). Foi utilizada uma solução de ASTM e DMSO em todos os ensaios como controlo negativo.

Com base na análise conjunta dos resultados do ensaio crónico com a 20-HE e com os resultados obtidos por outros autores (Peterson *et al.*, 2001; Baldwin *et al.*, 2001) escolhemos a concentração de 77 µg L<sup>-1</sup> para ser utilizada como controlo positivo nos ensaios e na co-administração aos pesticidas.

### IX.2.2. Teste de reprodução

Para avaliar os efeitos dos dois pesticidas no sistema ecdiesteróide do crustáceo *D. magna*, os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo da OCDE 211 (1998).

Juvenis com idade inferior a 24 horas, provenientes da cultura mantida em laboratório, foram expostas: ao controlo negativo ASTM e DMSO com uma concentração nominal de 0,001% (v/v); à 20-HE (77  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); e as concentrações dos pesticidas: atrazina (0,5; 5,0; 15  $\text{mg L}^{-1}$ ); endossulfão sulfato (91,7; 230, 460  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Os procedimentos e as condições de ensaio foram idênticos aos descritos no capítulo V. A taxa de reprodução foi determinada a partir do número de juvenis viáveis produzidos por fêmea. A frequência de mudança de carapaça foi avaliada pelo número de dias até atingir 4 mundaças de carapaça, a partir deste valor, foi calculado o período de mudança de carapaça

Previamente, realizámos um estudo crónico com concentrações nominais de 20-HE (77, 240, 480  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

### IX.2.3. Exposição de ovos de *D. magna* ao endossulfão sulfato e à atrazina

O ensaio *in vitro* de exposição directa dos embriões aos pesticidas foi preconizado de acordo com o descrito na secção material e métodos do capítulo V. As concentrações dos pesticidas utilizadas foram: endossulfão sulfato (91,7; 230; 460  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e atrazina (0,5; 5,0; 15  $\text{mg L}^{-1}$ ). Foi realizado um controlo de 20-HE (77  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Foram realizadas doze réplicas por concentração. Os ovos foram incubados a uma temperatura constante (20 $\pm$ 1  $^{\circ}\text{C}$ ) com um fotoperíodo de 16 horas dias e 8 horas noite. O desenvolvimento embrionário foi observado às 24, 48 e 96 horas. A percentagem de embriões que exibiram anomalias foi determinada por comparação com os grupos controlo.

#### IX.2.4. Co-administração de 20-HE

Foi avaliada a capacidade da hormona 20-HE co-administrada exógenamente reverter os efeitos tóxicos induzidos pelos pesticidas, no processo de mudança de carapaça e no desenvolvimento embrionário. Os protocolos seguidos foram idênticos aos acima descritos, com adição de  $77 \mu\text{g L}^{-1}$  de 20-HE a todas as concentrações de pesticidas.

#### IX. 2.5. Análise Estatística

A análise estatística dos efeitos tóxicos no processo de reprodução foi idêntica à descrita no capítulo V. Os valores de  $EC_{50}$  para as anomalias embrionárias foram estimados por regressão logística.

### IX. 3. Resultados e Discussão

O objectivo deste estudo foi avaliar a actividade anti-ecdiesteróide dos pesticidas endossulfão sulfato e atrazina.

Os efeitos observados na reprodução, após exposição das *Daphnias* a concentrações de  $77 \mu\text{g L}^{-1}$  de 20-HE, foram de uma redução de 23% da taxa de reprodução em relação ao controlo (Tabela IX.1). Para além disso, o aumento da concentração de 20-HE para  $480 \mu\text{g L}^{-1}$  induziu um acentuado decréscimo do número de juvenis por fêmea. No que respeita, ao efeito na mudança de carapaça, a concentração de  $77 \mu\text{g L}^{-1}$  de 20-HE, foi a única que não apresentou variabilidade significativa em relação ao controlo ( $p=0,084$ ) (Fig. IX. 1a). A percentagem de anomalias aumentou de 0 para 75% entre  $77$  e  $240 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. IX.1b).

**Tabela IX.1.** Número total de juvenis produzidos por fêmea, durante os 21 dias de exposição (média±desvio padrão, n=10). Foi usado o ASTM + DMSO como controlo negativo. \*Diferença significativa em relação ao controlo  $p<0,05$ .

	Concentrações	Total Juvenis / Fêmea
ASTM + DMSO	0	107,1±4,4
	77	83,3±8,4
20-HE ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	240	66,8±4,0*
	480	35,3±1,9*
Atrazina ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,5	74,7±8,0*
	5	73,3±4,1*
	15	19,6±3,3*
Endossulfão Sulfato ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	91,7	64,8±5,0*
	230	35,3±1,9*
	460 <sup>a</sup>	-

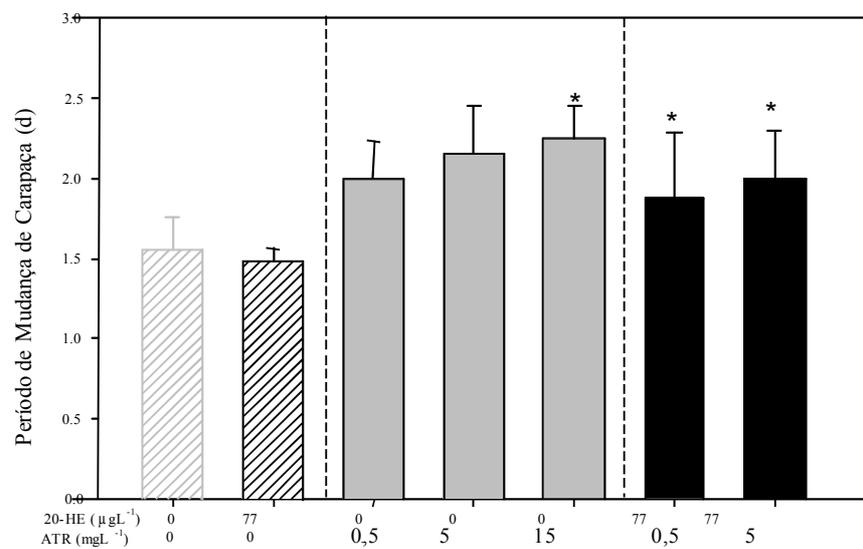
<sup>a</sup> - nesta concentração ocorreu a mortalidade de 100% das fêmeas.

A ligeira redução da reprodução, na concentração de  $77 \mu\text{g L}^{-1}$  de 20-HE, foi um efeito também observado por Peterson *et al.* (2001) para uma concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  e por Kleiven *et al.* (1992) para uma concentração mais elevada ( $480 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Baldwin *et al.* (2001) não observaram qualquer efeito no número de juvenis produzidos por *Daphnia*, para concentrações de  $62,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . O efeito negativo na taxa de reprodução para concentrações elevadas de 20-HE, pode ser atribuído à produção de ninhadas de menores dimensões e em menor número bem como, a um atraso no processo de mudança de carapaça como foi observado por Baldwin *et al.* (2001). Na concentração de  $77 \mu\text{g L}^{-1}$  não ocorreu o aparecimento de machos nem houve efeito na mudança de carapaça, o que já tinha sido observado por Mu e LeBlanc (2002a). No entanto, a partir das concentrações de  $240 \mu\text{g L}^{-1}$  houve um aumento da frequência de mudança de carapaça com um subsequente aumento da mortalidade das fêmeas e também um aumento das anomalias embrionárias. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Baldwin *et al.* (2001) no que respeita, ao aumento da mortalidade das fêmeas para concentrações superiores de hormona. Pelo contrário, num estudo com fenarimol, Mu e LeBlanc (2002b) não observaram qualquer efeito tóxico no desenvolvimento embrionário, quando da exposição dos embriões a concentrações de

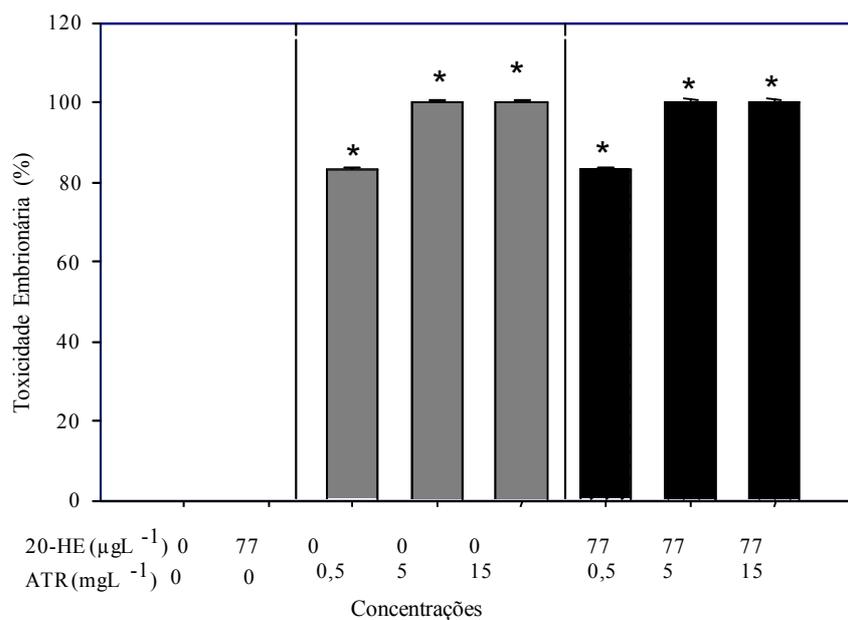
480  $\mu\text{g L}^{-1}$  de hormona. O valor de  $\text{EC}_{50}$  obtido no presente trabalho para a hormona foi de  $282,2 \pm 39,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela IX.2). Consequentemente, estes resultados em conjunto com resultados obtidos por outros autores (Kleiven *et al.*, 1992; Peterson *et al.*, 2001; Baldwin *et al.*, 2001) sugerem que a concentração de  $77 \mu\text{g L}^{-1}$  é uma das indicadas para ser usada em estudos de avaliação da actividade anti-ecdiesteróide.

A atrazina induziu uma significativa redução da taxa de reprodução, para todas as concentrações, resultado este suportado pelos ensaios anteriores do presente trabalho (capítulo VII, VIII) e, por outros estudos já mencionados (Kaushik *et al.*, 1985; Dodson *et al.*, 1999a). A co-administração de 20-HE à concentração de  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de atrazina induziu a mortalidade de todas as fêmeas. No estudo crónico da atrazina (capítulo VII) observou-se que a concentração de  $15 \text{ mg L}^{-1}$  não promoveu qualquer mortalidade nas *Daphnias*. Assim, pode-se sugerir que a hormona, nesta concentração, potenciou o efeito tóxico da atrazina. No que respeita à frequência de mudança de carapaça o efeito da atrazina isolada encontra-se representado na Figura IX.1a. (barras cinzentas). Observou-se um incremento do período de mudança de carapaça significativo, somente para a concentração mais elevada de  $1,85 \pm 0,07$  dias no controle para  $2,25 \pm 0,07$  dias na concentração de  $15 \text{ mg L}^{-1}$ . A co-administração de 20-HE promoveu uma ligeira diminuição da frequência sem reverter completamente o efeito tóxico (Fig. 1a, barras pretas).

A concentração mais baixa de atrazina testada induziu um aumento significativo de 83% de anomalias embrionárias (Fig. IX.1b, barras cinzentas) enquanto a maior concentração promoveu o aparecimento de 100% de anomalias. Os efeitos tóxicos que foram observados incluem anomalias em ambas as fases: gastrulação e organogénese. A percentagem e o perfil de anomalias observados foram similares após à co-administração de 20-HE, o que indica que a hormona não reverteu o efeito induzido pelo herbicida isolado. Este facto foi confirmado pelo valor de  $\text{EC}_{50}$ , pois obteve-se um valor de  $\text{EC}_{50}$  de  $0,42 \pm 0,85 \text{ mg L}^{-1}$  para ambos os tipos de exposição (Tabela IX.2). Estes resultados indicam que a toxicidade induzida pelo herbicida não é devida á sua acção no sistema ecdiesteróide do crustáceo.



(a)



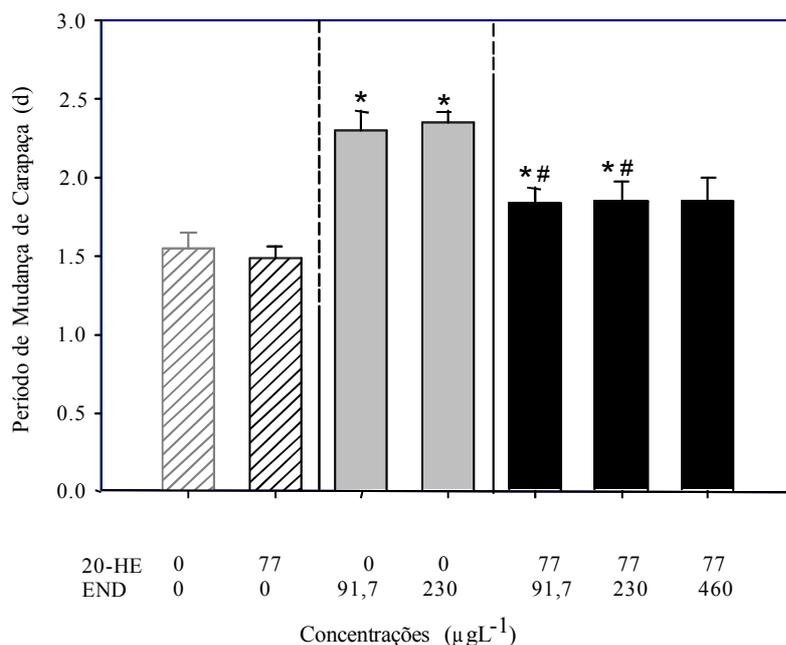
(b)

**Figura IX.1.** (a) Período de mudança de carapaça; e (b) Toxicidade embrionária (média±desvio padrão; n=10), para concentrações de atrazina (ATR) (barras cinzentas) e em mistura com 20-HE (barras pretas). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo (Teste de *Dunnnett's*;  $p < 0,05$ ).

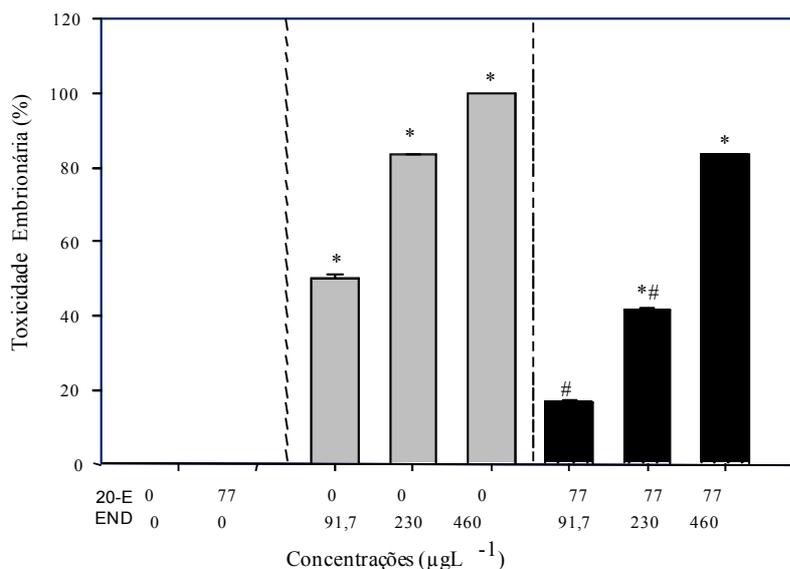
O maior impacte na reprodução foi promovido pelo endossulfão sulfato, onde a menor concentração utilizada induziu uma redução da taxa de reprodução de 61% ( $p=0,001$ ). A concentração mais elevada ( $460 \mu\text{g L}^{-1}$ ) promoveu a mortalidade de todas as *Daphnias* antes do final do teste. O pesticida induziu efeitos tóxicos significativos no processo de mudança de carapaça, com o aumento significativo do número de dias necessários para a realização de quarto mudas (Fig. IX.2a, barras cinzentas). No estudo crónico deste pesticida (capítulo VI), na concentração de  $460 \mu\text{g L}^{-1}$ , não ocorreu a morte das *Daphnias*, no entanto, observou-se um atraso acentuado no processo de mudança de carapaça com uma total inibição da produção de juvenis. Assim, os dois estudos apresentam resultados concordantes no que respeita ao efeito tóxico que o pesticida promoveu na diminuição da produção de juvenis e no processo de mudança de carapaça.

A co-administração da hormona 20-HE reverteu significativamente o número de dias necessários para a mudança de quatro carapaças em relação ao efeito do pesticida isolado (Fig. IX.2a, barras pretas). A mitigação dos efeitos tóxicos, após a administração da hormona 20-HE, foi observada para compostos que possuem propriedades anti-ecdiesteróides como a testosterona e o fenarimol (Mu e LeBlanc, 2002a; Mu e LeBlanc, 2002b; Barbosa *et al.*, 2008).

A exposição ao endossulfão sulfato isolado provocou um aumento das anomalias embrionárias, com diferenças significativas em relação ao controlo a partir da concentração de  $230 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. IX.2b, barras cinzentas). A co-exposição com 20-HE promoveu uma redução da percentagem de anomalias em comparação com o efeito induzido pelo pesticida isolado. Este decréscimo foi mais acentuado nas concentrações de  $91,7$  e  $230 \mu\text{g L}^{-1}$ .



(a)



(b)

**Figura IX.2.** (a) Período de mudança de carapaça; e (b) Toxicidade embrionária (média $\pm$ desvio padrão, n=10), para concentrações de endossulfão sulfato (END) (barras cinzentas) e em mistura com 20-HE (barras pretas). O ASTM + DMSO foi usado como controlo negativo. \* Diferença significativa em relação ao controlo; # Diferença significativa em relação ao pesticida sozinho (Teste de *Dunnnett's*;  $p<0,05$ ).

Os valores de EC<sub>50</sub> obtidos foram de 125,8 ± 22,3 µg L<sup>-1</sup> e de 282,0 ± 39,3 µg L<sup>-1</sup>, para o composto isolado e em mistura, respectivamente (Tabela IX.2). Assim, a co-administração de 20-HE, mitigou os efeitos no desenvolvimento embrionário induzidos pelo endossulfão sulfato. No entanto, para a concentração de 460 µg L<sup>-1</sup>, a acção da hormona não foi tão acentuada. Esta redução da capacidade da hormona reverter os efeitos no desenvolvimento embrionário, já tinha sido observada para a testosterona por Mu e LeBlanc (2002a). Este facto, sugere que o endossulfão sulfato pode induzir a toxicidade embrionária por um mecanismo independente do sistema ecdiesteróide, como foi descrito para a testosterona. Ou ainda, que as quantidades de hormona administradas não foram suficientes para reverter o efeito embriotóxico que ocorreu, nessa concentração.

**Tabela IX. 2.** Valores de EC<sub>50</sub> (média ±desvio padrão, n=12) para a indução de toxicidade embrionária, estimados a partir de regressão logística, dos pesticidas endossulfão sulfato, atrazina e da hormona 20-HE, isolados e em mistura.

	20-HE (µg L <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub>
<b>Atrazina</b>	0	0,42±0,85
<b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>	77	0,42±0,85
<b>Endossulfão sulfato</b>	0	125,8±22,3
<b>(µg L<sup>-1</sup>)</b>	77	282,0±39,3
<b>20-HE (µg L<sup>-1</sup>)</b>	-	282,2±39,2

Assim, e tendo em consideração o descrito por Subramoniam (2000) e Mu e LeBlanc (2004) em relação às origens das hormonas ecdiesteróides nos embriões, os resultados sugerem que o endossulfão sulfato actua como um antagonista dos receptores ecdiesteróides, uma vez que a exposição de embriões isolados, resultou no aparecimento de anomalias em ambos os estádios de desenvolvimento (iniciais e finais).

No entanto, no estudo de avaliação das características juvenóides (capítulo VIII) observou-se que, este pesticida actua como agonista do sistema juvenóide e apresenta características anti-juvenóide. Alguns estudos descrevem que os sistemas juvenóide e ecdiesteróide interagem (Adams *et al.*, 1992; Oberlander *et al.*, 1998; Restifo e Thomas, 1998). Para além disso, Mu e LeBlanc (2004) observaram que o aumento dos níveis de metilfarnesoato, na *D. magna*, inibiu alguns dos processos que se encontravam sob o controlo positivo do sistema ecdiesteróide. Assim, o endossulfão sulfato pode actuar como antagonista dos receptores ecdiesteróides ou induzir o aumento dos níveis de metilfarnesoato na *D. magna*, que por si só tem uma actividade anti-ecdiesteróide.

#### **IX.4. Conclusão**

Os resultados do estudo sugerem que de entre os pesticidas avaliados o endossulfão sulfato é o único que exerceu uma acção no sistema ecdiesteróide do crustáceo *D. magna*.

O endossulfão sulfato pode actuar como antagonista dos receptores ecdiesteróides ou induzir o aumento dos níveis de metilfarnesoato na *D. magna*, que por si só tem uma actividade anti-ecdiesteróide.

**PARTE C**

**CONCLUSÕES FINAIS**



## CONCLUSÕES FINAIS

A albufeira do Alqueva, devido à sua extensão, às fontes de poluição antropogénica referenciadas na área circundante à bacia, ao clima Mediterrânico onde está inserida e aos seus principais objectivos, é um dos sistemas hidráulicos de Portugal que maior preocupação ambiental tem suscitado. A implementação de programas de caracterização do ecossistema aquático e terrestre da sua área envolvente, bem como a avaliação de possíveis factores de *stress* ecológico são etapas prioritárias na gestão sustentável da massa de água. A avaliação físico-química e microbiológica com acesso a técnicas de análise multivariada permitiu concluir quais os factores antropogénicos responsáveis pela variabilidade da qualidade da água e quais os locais da albufeira que apresentam a água com menor qualidade. Assim, os parâmetros que mais influenciaram a variabilidade da água, no período em estudo, foram a matéria orgânica, os nutrientes, os herbicidas e os parâmetros microbiológicos. A integração dos resultados obtidos com a anterior referência das principais fontes de poluição caracterizadas permitem-nos apontar as actividades agrícolas, e as das descargas de efluentes industriais, nomeadamente provenientes de queijarias, suiniculturas, lagares e adegas como as principais fontes de poluição da albufeira, em território Português. A análise temporal permitiu concluir que no período húmido a variabilidade da qualidade da massa de água foi devida principalmente à sobrecarga de nutrientes e de matéria orgânica resultante de processos de lixiviação e de descargas directas para a bacia. Enquanto, no período seco a qualidade da água depende maioritariamente dos herbicidas aplicados nos campos agrícolas. A análise espacial permitiu identificar o troço a montante e os afluentes à albufeira como a área que apresentou pior qualidade de água.

A utilização de ensaios ecotoxicológicos na avaliação da qualidade da massa de água permitiu-nos caracterizar o impacto dos poluentes identificados/quantificados no ecossistema aquático em estudo e avaliar o seu possível efeito nefasto nas populações aí existentes. Os resultados ecotoxicológicos confirmaram os resultados da avaliação química e da quantificação de pesticidas, ou seja as amostras que apresentaram uma maior toxicidade eram provenientes do troço a montante da albufeira,

junto à fronteira com Espanha (Sra. Ajuda) e de áreas com intensa actividade agrícola e receptoreas de efluentes industriais não tratados (Álamos, Lucefecit).

A avaliação toxicológica aguda permitiu identificar duas espécies, o *Vibrio fisheri* e o *Thamnocephalus platyurus*, como organismos teste que devem integrar futuros programas de controlo de qualidade de água e de avaliação de risco ambiental desta albufeira. Enquanto, o *V. fisheri* foi mais sensível a amostras que continham maior quantidade de nutrientes, metais e carga orgânica, isto é amostras provenientes do período húmido, o *T. platyurus* foi mais sensível a amostras do período seco, que continham uma maior quantidade de pesticidas. Na avaliação toxicológica crónica observou-se o decréscimo da taxa de reprodução, pela diminuição do número de juvenis por fêmeas, do crustáceo *D. magna* em todos os locais de amostragem, no período seco, o que pode indiciar um impacte ecológico real, nesse período, em algumas populações de crustáceos existentes no ecossistema aquático em estudo.

A quantificação dos pesticidas prioritários identificou um grupo de pesticidas que deve ser monitorizado na albufeira, ou seja: atrazina, simazina, terbutilazina, clorpirifos, endossulfão sulfato, diurão, diazinão, metolacoloro e linurão. Os herbicidas e o clorpirifos apresentam uma variabilidade sazonal, o que nos indica que o seu risco ecológico está limitado a um período de tempo, geralmente o que se segue à sua aplicação. O endossulfão sulfato, diazinão, metolacoloro e linurão foram detectados em concentrações baixas mas durante longos períodos de tempo, o que pode indicar que estes pesticidas persistem na massa de água e podem constituir um potencial risco para o ecossistema aquático em estudo. Além disso, o aumento da irrigação, promovido pela construção do Alqueva, vai incentivar práticas agrícolas cada vez mais agressivas que libertam por escorrência, maiores concentrações de pesticidas, acarretando desta forma maior preocupação para a gestão sustentável da qualidade da massa de água.

A aplicação dos padrões de qualidade ambiental possibilitou a identificação de pesticidas, como a atrazina, o diurão e o clorpirifos, que foram detectados em concentrações superior aos PQA propostos, e por isso representam um potencial risco agudo e/ou crónico para as espécies do ecossistema aquático em estudo em determinados períodos de tempo.

Para o endossulfão sulfato não foi estabelecido qualquer risco ecológico uma vez que, os padrões de qualidade ambiental estão propostos somente para o seu precursor endossulfão. No entanto, os valores quantificados na albufeira de endossulfão sulfato estão acima quer da média anual, quer da concentração máxima admissível estipuladas para o seu precursor. Este facto é de salientar, na medida em que, quando se realizou a avaliação ecotoxicológica do endossulfão sulfato concluiu-se que este promovia efeito tóxico em concentrações inferiores às descritas para o seu precursor, e induziu efeitos tóxicos que até agora não tinham sido referenciados para o endossulfão, nomeadamente estimulação da produção de machos e alterações no processo de crescimento do crustáceo.

Nos ensaios laboratoriais de exposição aguda, com os pesticidas seleccionados, concluiu-se que o clorpirifos foi o pesticida que promoveu maior efeito tóxico em qualquer uma das espécies usadas. Os efeitos tóxicos deste pesticida ocorreram em concentrações similares às detectadas na albufeira, o que indica o risco ecológico real/actual deste pesticida para o ecossistema aquático em estudo.

A avaliação ecotoxicológica crónica dos pesticidas possibilitou concluir que os três pesticidas induzem um decréscimo da taxa de reprodução e um aumento das anomalias em juvenis e embriões da espécie *D. magna*. Apesar, da atrazina ser o pesticida que foi detectado em maior concentração na albufeira, e que ultrapassou os limites de VMA e de PQA propostos, os resultados laboratoriais indicam que os seus efeitos tóxicos ocorrem para concentrações muito superiores às quantificadas na massa de água. Por outro lado, a atrazina foi detectada no período após a sua aplicação, com um tempo de semi-vida na água curto, ou seja, apresenta pouca persistência ambiental. Estes resultados indicam que a atrazina não representa um risco ambiental para as comunidades do ecossistema em estudo, no entanto estudos devem ser realizados para se avaliar o efeito de concentrações subletais menores e o seu efeito em misturas. O endossulfão sulfato é dos três pesticidas o que actua nos processos de maturação, ou seja, no crescimento e na mudança de carapaça do crustáceo. Os ensaios laboratoriais com endossulfão foram realizados com concentrações superiores as detectadas na albufeira, no entanto as características de bioacumalação, biomagnificação e de persistência ambiental deste composto, são factores que podem potenciar o seu risco

ambiental neste ecossistema e que devem ser estudados. O clorpirifos foi o único dos pesticidas, em estudo, que induziu efeitos tóxicos agudos e subletais, em concentrações similares e menores às quantificadas na albufeira.

Assim, a avaliação dos resultados laboratoriais dos pesticidas isolados em paralelo com os resultados ecotoxicológicos das amostras de água permitiu concluir que algumas das espécies de crustáceos, aí existentes, nomeadamente cladóceros, podem estar a sofrer impactos negativos importantes em determinados períodos do ano hidrológico.

A avaliação preconizada para o sistema endócrino de *D. magna* mostrou que dos três pesticidas o endossulfão sulfato foi o único que actuou no sistema juvenóide e ecdiesteróide do crustáceo. O efeito juvenóide/ anti-jjuvenóide que se observou sugere que o endossulfão sulfato exerce a sua acção por ligação ao receptor juvenóide, com a estimulação da produção de metilfarnesoato. Por outro lado, o efeito anti-ecdiesteróide observado pode ser devido quer à sua acção no sistema ecdiesteróide, actuando nos receptor ecdiesteróide e inibindo a síntese de hormona endógena, quer à sua acção juvenóide, promovendo o aumento dos níveis de metilfarnesoato com a consequente inibição dos processos regulados pelo sistema ecdiesteróide.

No que respeita à acção juvenóide da atrazina no sistema endócrino do crustáceo, e apesar de se ter observado o aparecimento de machos, deve ser feita alguma salvaguarda, pois as concentrações que promoveram o aparecimento de machos foram muito elevadas em comparação com os níveis ambientais, e os vários estudos até agora realizados com o herbicida, não são conclusivos e não sustentam a hipótese de actividade juvenóide do herbicida. No entanto, a sua acção anti-jjuvenóide foi bastante marcada, o que indica que o herbicida exerce efeito no sistema endócrino do crustáceo, e em mistura e na presença de potentes activadores do metilfarnesoato possa reverter a sua acção, como ocorreu com o fenoxicarbe. Este efeito pode ter repercussões em termos ambientais.

A integração e validação destes resultados com trabalhos de investigação a desenvolver na área são imprescindíveis pois: (i) demonstram a necessidade de alterar práticas agrícolas agressivas e de implementar sistemas de tratamento de águas residuais industriais, como principais medidas de gestão sustentável da massa de água; e (ii) possibilitam a criação de alternativas credíveis e sustentadas para os agricultores e gestores industriais, indicando quais as orientações que devem ser seguidas para melhoria da qualidade da massa de água. O que contribuirá, para uma garantia da melhoria do potencial ecológico e da qualidade da água usada para abastecimento ou para rega, de massa de água. Por outro lado, a obtenção de um grupo de ferramentas sensíveis e de fácil utilização vai permitir criar um modelo preditivo imprescindível em processos de avaliação de risco de base científica reforçada, indispensáveis para os sistemas de decisão. Possibilitando, desta forma, a implementação de medidas de gestão de risco cada mais vez mais direccionadas para cada situação ambiental em particular, e com menor número de factores “*confounding*” com a aplicação de medidas de mitigação e reabilitação específicas e a consequente melhoria do estado ecológico dos ecossistemas aquáticos e indirectamente da qualidade de vida dos cidadãos.

### **TRABALHOS DE INVESTIGAÇÃO A DESENVOLVER**

Os resultados da caracterização da qualidade da água da albufeira sugerem que devem ser implementados programas de avaliação de risco ambiental, com a caracterização físico-química e ecotoxicológica da coluna de água e dos sedimentos.

Num programa de avaliação ecotoxicológica devem ser integrados outros bioindicadores: (i) produtores primários (algas e plantas aquáticas) devido a serem espécies mais sensíveis à contaminação das águas por herbicidas, (ii) consumidores secundários (peixes), para a avaliação dos efeitos tóxicos e dos processos de biacumulação e biomagnificação da cadeia trófica; (iii) macroinvertebrados bentónicos, na avaliação dos efeitos induzidos pelo sedimento, pois vários compostos, nomeadamente, metais devido às suas características podem estar adsorvidos a este compartimento abiótico.

O presente estudo realça, ainda, a necessidade da caracterização dos perfis toxicológicos dos restantes pesticidas predominantes na albufeira, bem como a necessidade de estabelecer os possíveis efeitos sinérgicos, potenciadores e aditivos entre os vários compostos quantificados.

Os ensaios de desregulação dos pesticidas em estudo, nomeadamente do endossulfão sulfato e atrazina, devem ser complementados e sustentados por estudos futuros de quantificação dos níveis das hormonas ecdisona, 20-hidroxiectidione e metilfarnesoato nos crustáceos e nos meios de exposição, com o objectivo de clarificar o mecanismo de acção dos pesticidas no sistema endócrino do crustáceo.

Finalmente, os nossos resultados também sugerem a realização de estudos de avaliação dos efeitos induzidos por doses ambientais dos pesticidas detectados na massa de água, bem como a necessidade de estabelecer os efeitos induzidos por misturas destes compostos, forma natural de ocorrência dos compostos no ambiente.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



Abe, T., Saito, H., Niikura, Y., Shigeoka, T., Nakano, Y. 2000. Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere*. 45: 487-495.

ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). 1986. Documentation of the threshold limits values and biological exposure indices. 5<sup>th</sup> edition. Cincinnati, OH. pp 5-48.

Adams, M.J. 1998. The principles of multivariate data analysis. In: Analytical Methods of Food Authentication. P.R. Ashurst e M.J. Dennis (eds). Blackie Academic e Professional, London, UK.

Adams, T.S., Gerst, J.W. 1992. Interaction between diet and hormones on vitellogenin levels in the housefly, *Musca domestica*. *Invertebr Reprod Dev*. 21: 91-98.

Aguilar, C., Ferrer, I., Borrull, F., Marcé, R.M., Barceló, D. 1999. Monitoring of pesticides in river water based on samples previously stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 386: 237-248.

Alabaster, J.S. 1969. Survival of fish in 164 herbicides, insecticides, fungicides, wetting agents and miscellaneous substances. *Int Pestic Control*. 11: 29-35.

Albanis, T.A., Hela, D.G., Sakellarides, T.M., Konstantinou, I.K. 1998. Monitoring of pesticides residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography. *J Chromatog A*. 823: 59-71.

Albiac, J., Matínez, Y.; Tapia, J. 2005. Water quantity and quality issues in Mediterranean agriculture. In: OECD Workshop on Agriculture and Water: Sustainability, Markets and Policies. Australia.

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

Almeida, C.A., Quintar, S., González, P., Mallea, M. A. 2007. Influence of urbanization and tourist activities on the water quality of the Potrero de los Funes River (San Luis – Argentina). *Environ Monit Assess.* 133:459-465.

Alonso, E., Santos, A., Callejón, M., Jiménez, J.C. 2004. Speciation as a screening tool for the determination of heavy metals surface water pollution in the Guadiamar river basin. *Chemosphere.* 56: 561-570.

Amaral, M. J. 2002. The endocrine disruptors: a major medical challenge. *Food Chem Toxicol.* 40: 781-788.

Antunes, S.C., Figueiredo, D.R., Marques, S.M., Castro, B.B., Pereira, R., Gonçalves, F. 2007. Evaluation of water column and sediments toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Sci Total Environ* 374: 252-259.

APHA (America Public Health Association). 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20<sup>th</sup> edition. New York.

ASTM (Americam Society for Testing and Materials). 1993. Standart guide for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians (E729-88a). In: ASTM Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. Ann Arbor MI: ASTM.

ASTM (Americam Society for Testing and Materials). 1998. Standard practice for conducting toxicity tests with fishes, microinvertebrates and amphibians. E729-90. In: Annual Book of ASTM Standards. American Society of Testing materials, Philadelphia. pp. 271-296.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Register). 1990. Toxicological profile for endosulfan. Draft Report. Atlanta. GA. pp 6-52.

Baird, C. 1999. Environmental Chemistry. Eds. W. H. Freeman and Company, 2<sup>nd</sup> edition, New York.

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

Baird, D.J., Barber, I., Soares, A.M.V.M., Calow, P. 1991. An early life-stage test with *Daphnia magna* Straus: An alternative to the 21-day chronic test? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22: 1-7.

Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Girling, A., Barber, I., Bradley, M., Calow, P. 1989b. The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. In: Lokke, H., Tyle, H., Bro-Rasmussen, F. (eds.), *Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology*. 17-18 October, Lyngby. pp 144-148.

Baldwin, W.S., Bailey, R., Long, K.E., Klaine, S. 2001. Incomplete ecdysis is an indicator of ecdysteroid exposure in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1564-1569.

Baldwin, W.S., Milam, D.L., LeBlanc G.A. 1995. Physiological and biochemical perturbation in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol. *Environ Toxicol. Chem.* 14: 945-952.

Banks, K.E., Turner, P.K., Wood, S.H., Matthews, C. 2005. Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazina and diazinon at environmentally realistic concentrations. *Ecotox Environ Safe.* 60: 28-36.

Baptista, J.M., Almeida, M.C., Vieira, P., Moura e Silva, A. C., Ribeiro, R., Marçal Fernando, R., Serafim, A., Alves, I., Carneira, M.R. 2001. Programa Nacional para o Uso Eficiente da Água (Versão Preliminar). Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Instituto da Água.

Barbosa, I.A., Martins, R.M., Sá e Melo, M.L., Soares, A.M.V.M. 2003. Acute and Chronic toxicity of dimethylsulfoxide to *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70: 1264-1268.

Barbosa, I.R., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2008. Acute and chronic effects of testosterone and 4-hydroxyandrostenedione to the crustacean *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71: 757-764.

Baron, J.S., LeRoy Poff, N., Angermeier, P.L., Dahm, C. N., Gleick, P.H., Hairston, N.G., Hairston, Jr. N.G., Jackson, R.B., Johnston, C.A., Ritzer, B.D., Steinman, A.D. 2003. Sustaining Healthy Freshwater Ecosystems. Issues in Ecology. Number 10.

Barron, M.G., Woodburn, K. B. 1995. Ecotoxicology of chlorpyrifos. Rev Environ Contam Toxicol. 144: 1-93.

Barry, M.J., Logan, D.C., Ahokas, J.T., Holdway, D.A. 1995. Effect of algal food concentration on toxicity of two agricultural pesticides to *Daphnia carinata*. Ecotox Environ Safe. 32: 273-279.

Bartram, J., Helmer, R. 1996. Introduction. In: Water Quality Monitoring – A practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes. Jamie Bartram and Richard Balance (eds.). United Nations.

Belden, J. B., Lydy, M. J. 2000. Impact of atrazina on organophosphate insecticide toxicity. Environ Toxicol Chem. 19: 2266-2274.

Berger, B. 1998. Improved chromatographic method for the simultaneous determination of ten phenylurea herbicides and some of their degradation products in soil. J. Chromatography A. 769: 338-342.

Bern, H.A. 1992. The fragile fetus. In: Chemically-Induced alterations in sexual and functional development: The Wildlife/Human Connection. Colburn, T., Clement, C. (eds). Princeton Scientific Publishing. Princeton, N.J. pp 9-15.

Bonada, N., Prat, N., Resh, V.H., Statzner, B. 2006. Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 495-523.

Borton, S. A., Davis, W. P. 1994. Fish intersexuality as indicator of environmental stress. *Bioscience* 44: 165-172.

Boyacioglu, H. 2006. Surface water quality assessment using factor analysis. *Water S.A.* 32: 389-393.

Boyd, G.H., Reemtsma, H., Grimm, D.A., Mitra, S. 2003. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci Total Environ.* 311: 135-149.

Brack, W., Bakker, J., de Deckere, E., Deerenberg, C., van Gils, J., Hein, M., Jurajda, P., Kooijman, S. A. L. M., Lamoree, M. H., Lek, S., López de Alda, M.J., Marcomini, A., Muñoz, I., Rattei, S., Segner, H., Thomas, K., von der Ohe, P.C., Westrich, B., de Zwart, D., Schmitt-Jansen, M. 2005. MODELKEY Models for assessing and forecasting the impact of environmental key pollutants on freshwater and marine ecosystems and biodiversity. *Env Sci Pollut Res.* 12: 252-256.

Brack, W., Klamer, H.J.C., López de Alda, M., Barceló, D. 2007. Effect-Direct analysis of key toxicans in European River Basins: A review. *Env Sci Pollut Res.* 14: 30-38.

Bradlow, H.L., Davis, D.L., Lin, G.; Sepkovic, D., Tiwari, R. 1995. Effects of pesticides on the ratio of 16 $\alpha$ /2-hydroxyestrone: A biological marker of breast cancer risk. *Environ Health Perspect.* 103: 147-150.

Brainwood, M.A.; Burgin, S.; Maheshwari, B. 2004. Temporal variations in water quality of farm dams: impacts of land use and water sources. *Agri Water Manage.* 70: 151-175.

Breck, J.E. 1988. Relationship among models for acute toxic effects: Applications to fluctuating concentrations. *Environ Toxicol Chem.* 17: 2091-2099.

Breitholtz, M., Rudén, C., Hansson, S. O., Bengtsson, B. 2006. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. *Ecotox Environ Safe.* 63: 324-335.

Brown, J.R., Chow, L.Y. 1974. The effect of Dursban on microflora in non-saline waters. In: pesticides. IUPAC International Congress on Pesticide Chemistry. *Environ Qual Safe.* 3: 774-779.

Bruchet, A., Prompsy, C., Fillippi, G., Souall, A. 2002. A broad spectrum analytical scheme for the screening of endocrine disruptors (EDs), pharmaceuticals and personal care products in wastewaters and natural waters. *Water Sci Technol.* 46: 97-104.

Burkhard, N., Guth, J.A. 1981. Chemical hydrolysis of 2-chloro-4,6-(bisalkyl-amino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption. *Pestic. Sci.* 12: 45-52.

Butler, G.L., Deason, T.R., O'Kelly, J.C. 1975. The effect of atrazine, 2,4-D, methoxychlor, carbaryl and diazinon on the growth of planktonic algae. *Brit Phycol J.* 10: 371-376.

Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Fernández-Laespada, M.E., Calvo-Serono, L., Sánchez-San Román, F.J. 2003. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res.* 37: 928-938.

Cardozo, T.R., Rosa, D.P., Feiden, I.R., Rocha, J.A.V., Oliveira, N.C.A., Pereira, T.S.P., Patoriza, T.F., Marque, D.M., Lemos, C.T., Terra, N.R., Vargas, V.M.F. 2006. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basin. *Mutat Res.* 603: 83-96.

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N. E. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit Med J.* 305: 609-613.

Cerejeira, M. J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M. J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A. M. 2003. Pesticides in Portugal surface and ground waters. *Water Res.* 37: 1055-1063.

Chambers, H.W., Boone, J.S., Carr, R.L., Chambers, J.E. 2001. Chemistry of organophosphorus insecticides. In: *Handbook of pesticides toxicology*. Robert, I.K. (eds.). 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press. California, USA. pp 913-917.

Chandler, G.T., Green, A.S. 2001. Developmental stage-specific life-cycle bioassay for assessment of sediment-associated toxicant effects on benthic copepod production. *Environ Toxicol Chem.* 20: 171-178.

Chang, E.S. 1993. Comparative endocrinology of moulting and reproduction: Insects and crustaceans. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 161-180.

Chang, E.S., O'Connor, D. 1988. Crustacea. Moulting. In Laufer H, Downer G. H (eds). *Endocrinology of selected Invertebrate Types*. Alan R. Liss, New York, NY, USA. pp 259-278.

Chang, S.C., Chang, S.A., Mulder, E.P. 2001. Hormones in the lives of crustaceans: An overview. *Amer Zool.* 41: 1090-1097.

Chapman, D. 1992. *Water Quality Assessment*. D. Chapman on behalf of UNESCO, WHO and UNEP (eds). Chapman e Hall, London. pp. 585.

Chapman, D., Jackson, J. 1996. Biological Monitoring. In: *Water Quality Monitoring – A practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes*. Jamie Bartram and Richard Balance (eds.). United Nations Environment Programme and World Health Organization. Chapter 11.

Charles, G.D. 2004. *In vitro* models in endocrine disruptor screening. *ILAR Journal.* 45: 494-501.

Chícharo, L., Chícharo, M.A., Ben-Hamadou, R. 2006. Use of a hydrotechnical infrastructure (Alqueva Dam) to regulate planktonic assemblages in the Guadiana estuary: Basis for sustainable water and ecosystem services management. *Estuar Coast Shelf S.* 70: 3-18.

Chícharo, L., Chícharo, M.A., Esteves, E., Andrade, P., Morais, P. 2002. Effects of alterations in freshwater supply abundance and distribution of *Engraulis encrasicolus* in the Guadiana Estuary and adjacent coastal areas of south Portugal. *Journal of Ecohydrology and Hydrobiology*. 1: 195-200.

Christin, M.S., Ménard, L., Gendron, A.D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Rollins-Smith, L., Fournier, M. 2004. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquat Toxicol* 67: 33-43.

Claver, A., Ormad, P., Rodríguez, L., Ovelleiro, J.L. 2006. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere*. 64: 1437-1443.

Colborn, T., von Saal, F.S., Soto, A.M. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*. 101: 378-384.

Comber, S.D.W. 1999. Abiotic persistence of atrazine and simazine in water. *Pestic Sci*. 55: 696-702.

Corell, D.L., Wu, T.L. 1982. Atrazine toxicity to submersed vascular plants in simulated estuarine microcosms. *Aquat Bot*. 14: 151-158.

Correljé, A., Francois, D., Verbeke, T. 2007. Integrating water management and principles of policy: towards an EU framework? *J Clean Prod*. 15: 1499-1506.

Cortes, R.M.V., Ferreira, M. T., Oliveira, J.M., Godinho, F.N. 1996. Indicadores de qualidade biológica da água aplicados à Bacia do Guadiana. *Recursos Hídricos*. 17: 9-20.

Crane M., Burton G.A. Jr., Culp J.M., Greenberg M.S., Munkittrick K.R., Ribeiro R., Salazar M.H., St-Jean S.D. 2007. Review of aquatic *in situ* approaches for stressor and effect diagnosis. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3: 234– 245.

Crisp, T.M. 1997. Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. EPA/630/R-96/012. U.S. Environmental Protection Agency, Springfield, VA.

Cunningham, W. P., Cunningham, M. 2004. Water: Resources and Pollution. In: Principles of Environmental Science – Inquiry and Applications. McGrawHill. 2<sup>nd</sup> edition. pp 224-253.

Daniel, T.C., Sharpley, A.N., Lemunyon, J.L. 1998. Agricultural phosphorus and eutrophication: a symposium overview. *J. Environ Qual.* 27: 251-257.

Danzo, B. J. 1998. The effects of environmental hormones on reproduction. *Cell Mol Life Sci.* 54: 1249-1264.

Dave, G. 1993. Replicability, repeatability and reproducibility of embryo-larval toxicity tests with fish. In: Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests. Soares, A.M.V.M., Calow, P. (eds), Lewis, Boca Raton, FL. pp 129-157

Davey, K.G. 2000. The modes of action of juveniles hormones. Some questions we ought to ask. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 663-669.

Davis, D.L., Bradlow, H. L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D. G., Anton-Culver, H. 1993. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect.* 101: 372-377.

Davis, J.P., Koop, K. 2001. Current understanding of the eutrophication process in Australia. In. Proceedings of the Sixth International Association of Hydrological of Water Resources. Schumann, A.H., Acreman, M.C., Davis, J.R., Marino, M.A., Rosbjerg, D., Jun, X. (eds.). IAHS Publication, Maastricht. The Neatherlands. Vol. 268. pp 89-95.

De Loff, A., Huybrechts, R. 1998. Insects do not have sex hormones: A Myth? *Gen Comp Endocrinol.* 111: 245-260.

Decreto Regulamentar nº 16/2001 de 5 de Dezembro. Diário da República nº 281/2001 – Série I-B. Plano da Bacia Hidrográfica do Guadiana. Ministério do Planeamento e da Administração do Território, Lisboa.

Decreto Regulamentar nº 2/88 de 20 de Janeiro. Diário da República nº 16/1988 – 1ª Série. Classifica, para efeitos da aplicação do Decreto-Lei n.º 502/71, de 18 de Novembro, as albufeiras de águas públicas de serviço público. Ministério do Planeamento e da Administração do Território, Lisboa.

Decreto-Lei nº 112/2002, de 17 Abril. Diário da República nº 90/2002 – Série I-A. Aprova o Plano Nacional da Água. Ministério do Ambiente e Planeamento do Território.

Decreto-Lei nº 236/98, de 1 Agosto. 1998. Diário da República nº 176/98 – I Série A. Estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. Revoga o Decreto-Lei n.º 74/90, de 7 de Março. Ministério do Ambiente. Lisboa.

Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 Agosto. Diário da República nº 164/2007 – 1ª Série. Estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, procedendo à revisão do Decreto-Lei nº 243/2001, de 5 de Setembro, que transpõe para a ordem jurídica interna a Directiva nº 98/83/CE do Conselho de 3 de Novembro. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.

Deely, J.M., Ferguson, J.E. 1994. Heavy metal and organic matter concentrations and distributions in dated sediments of small estuary adjacent to small urban area. *Sci Total Environ.* 153: 97-111.

deFur, P.L. 2004. Use and role of invertebrate models in endocrine disruptor research and testing. *ILAR Journal.* 45: 484-493.

deFur, P.L., Crane, M., Ingersoll, C., Tattersfield, L. 1999. Endocrine disruption in invertebrates. In: *Endocrinology, Testing and Assessment.* Pensacola FL. SETAC Press.

Degen, G. H., Bolt, H. M. 2000. Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *Int Arch Occ Env Hea.* 37: 433-441.

Delistraty, D., Yokel, J. 2007. Chemical and ecotoxicological characterization of Columbia River sediments below the Hanford site (USA). *Ecotox Environ Safe.* 66: 16-28.

DellaGreca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Previtiera, L., Rubino, M., Temussi, F. 2004. Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivates on aquatic organisms. *Chemosphere.* 54: 629-637

DeLorenzo, M.E., Taylor, L.A., Lund, S.A., Pennington, P.L., Strozier, E.D., Fulton, M.H. 2002. Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplakton and zooplankton. *Arch Environ Contam Toxicol.* 42: 173-181.

Dhadialla, T.S., Tzertzinis, G. 1997. Characterization of partial cloning of ecdysteroid receptor from cotton boll weevil embryonic cell line. *Arch Insect Biochem Physiol.* 35: 45-57.

Dias, J.M.A., Gonzalez, R., Ferreira, Ó. 2004. Natural *versus* anthropic causes in variations of sand export from river basins: an example from the Guadiana River mouth (Southwestern Iberia). *Polish Geological Institute Special Papers* 11: 95-102.

Diaz-Baez, M.C., Sánchez, W.A., Dutka, B.J., Ronco, A., Castillo, G., Pica-Granados, Y., Castillo, L.E., Ridal, J., Arkhipchuk, V., Srivastava, R.C. 2002. Overview of results from the WaterTox intercalibration and environmental testing phase II program: Part 2, Ecotoxicological evaluation of drinking water supplies. *Environ Toxicol.* 17: 241-249.

DIN EN ISO 6468. 1996. Water quality - Determination of certain organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls and chlorobenzenes - Gas-chromatographic method after liquid-liquid extraction. German version.

Dinan, L., Bourne, P., Whiting, P., Dhadialla, T.S., Hutchinson, T.H. 2001. Screening of environmental contaminats for ecdysteroid agonist and antagonist activity using *Drosophila melanogaster* B11 cell *in vitro* assay. *Environ Toxicol Chem.* 20: 2038-2046.

Dodson, S. I., Hanazato, T. 1995. Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on the development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. *Environ Health Perspect.* 129: 7-11.

Dodson, S.I., Frey, D.G. 1991. Cladocera and other Branchiopoda. In: *Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates*. Thorp JH, Covich AP. (eds.). Academic Press, San Diego, CA. pp 723.

Dodson, S.I., Merrit, C.M., Shannahan, J.P., Shults, C.M. 1999a. Low exposure concentrations of Atrazine increase male production in *Daphnia pulex*. *Environ Toxicol Chem* 7: 1568-1573.

Dodson, S.I., Merrit, C.M., Torrentera, L., Winter, K.M., Tornehl, C.K., Girvin, K. 1999b. Dieldrin reduces male production and sex ratio in *Daphnia galeata mendotae*. *Toxicol. Ind. Health.* 15: 192-199.

Donohue, I., Martin, L., McGarrigle, M.L., Mills, P. 2006. Linking catchments characteristics and water chemistry with the ecological status of Irish rivers. *Water Res.* 40: 91-98.

Donohue, I., Style, D., Coxon, C., Irvine, K. 2005. Importance of spatial and temporal patterns for assessment of risk of diffuse nutrient emissions to surface waters. *J. Hydrol.* 304: 183-192.

Ebert, E., Dumford, S.W. 1976. Effects of triazine herbicides on the physiology of plants. *Residue Rev.* 65: 2-103.

ECC (European Community Commission) (2007) European Parliament and the Council European Parliament legislative resolution of 22 May on the proposal for a directive on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC.

ECC (European Community Commission). 1975. Commission Directive 75/440/EEC of 16 June. Quality required of surface water intended for the abstraction of drinking water. *Official J Eur Commun.*

ECC (European Community Commission). 1976. Commission Directive 76/464/EEC of 4 May. Water pollution by discharges of certain dangerous substances. Official J Eur Commun.

ECC (European Community Commission). 1991a Commission Directive 91/676/EEC of 12 December. Concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. Official J Eur Commun.

ECC (European Community Commission). 1991b Commission Directive 91/414/EEC of 15 July. Concerning the placing of plant protection products on the market. Official J Eur Commun.

ECC (European Community Commission). 1996. Technical guidance documents in support of Directive 93/67/EEC on risk assessment of new notified substances and regulation (EC) N°1488/94 on risk assessment of existing substances (Parts I, II, III and IV). Official J Eur Commun.

ECC (European Community Commission). 1998a. Commission Directive 98/83/EEC of 3 November. Quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Communities.

ECC (European Community Commission). 1998b. N° 98/8 of 16 February 1998. On the placing of biocidal products on the market. Official Journal of the European Communities No.L 123.

ECC (European Community Commission). 1998c. Peer Review Programme – Endosulfan. Vol. 3 Annex B, Pesticide Safety Directorate/ECCO Team.

ECC (European Community Commission). 2000. Commission Directive 2000/60/ECC of 23 October. The EU Water Framework Directive - integrated river basin management for Europe. Official J Eur Commun.

EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening and testing Advisory Committee). 1998. Final Report, US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

EEA (European Environmental Agency). 2005. Sectoral Use of Water in Regions of Europe. Copenhagen.

EEA (European Environmental Agency). 2007. Source apportionment of Nitrogen and Phosphorus inputs into aquatic environment. Report No. 7. Copenhagen.

Eisler, R. 1989. Atrazine hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. Contaminant hazard reviews Report 18. Biological report 85. U.S. Fish and Wildlife Services, Washington, DC.

EPA (Environmental Protection Agency). 2003. Agricultural Non Point Source Pollution. In: National Management Measures to Control Non Point Pollution from Agriculture. EPA 841-B-03-004. pp 9- 30.

Erickson, B. 1998. Screening and testing for Endocrine Disruptors. Anal. Chem. 70: 528-532A.

EXTOXNET (Extension Toxicology Network). 1996a. Pesticide Information Profiles: Chlorpyrifos. USA.

Falconer, I.R., Chapman, H.F., Moore, M. R., Ranmuthugala, G. 2006. Endocrine-Disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. Environ Toxicol. 21: 181-191.

Fernández, S., Villanueva, U., de Diego, A., Arana, G., Madariaga, J. M. 2008. Monitoring trace elements (Al, As, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni and Zn) in deep and surface waters of the estuary of the Nerbioi-Ibaizabal River (Bay of Biscay, Basque Country). J. Mar. Syst. 72: 332-341.

Fernandez-Casalderrey, A., Ferrando, M. D., Andreumoler, E. 1993. Effects of endosulfan on survival, growth and reproduction of *Daphnia magna*. Comp. Biochemistry Physiology C. 106: 437-441.

Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. Cambridge, UK. Cambridge University Press.

Fischer, R. 1985. The Effect of Endosulfan to *Scenedesmus subspicatus* (green algae) in a Growth Inhibition Test (Method OECD). AgrEvo Doc. No. A31389.

Fitzmayer, K. M., Geiger, J. G., van den Avyle, M. J. 1982. Effects of chronic exposure to simazine on the cladoceran *Daphnia pulex*. Arch Environ Contam Toxicol. 11: 603-609.

Foersom, L.L., DeFur, P.L., Tuberty, S. 2001. Effects of endosulfan on moulting in juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarki*. Annual meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Baltimore MD. Pensacola FL: SETAC Press.

Forget, G., Gagnon, P., Sanchez, W.A., Dutka, B.J. 2000. Overview of methods and results of the eight countries International Development Research Centre (IDRC) WaterTox Project. Environ Toxicol. 15: 264-276.

Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., Leboulenger, F. 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). Ecotox Environ Safe. 60: 288-294.

Forney, D.R., Davis, D.E. 1981. Effects of low concentrations of herbicides on submersed aquatic plants. Weed Sci. 26: 677-685.

Fry, D. M. 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. Environ Health Perspect. 103: 163-171.

Fulton, M.H., Key, P.B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environ Toxicol Chem. 20: 37-45.

Gallo, M. A., Lawryk, N.J. 1991. Organic phosphorus pesticides. In: Handbook of Pesticide Toxicology. Hayes, W. J. Jr.; Laws, E. R. Jr. (eds.) Academic Press, New York. pp 5-3.

Galvão, H. M., Reis, M. P., Valério, E., Domingues, R.B., Costa, C., Lourenço, D., Condiño, S., Miguel, R., Barbosa, A., Gago, C., Faria, N., Paulino, S., Pereira, P. 2008. Cyanobacteria blooms in natural waters in Southern Portugal – A water management perspective. Aquat Microb Ecol. 53: 129-140.

García-Ripoll, A., Amat, A.M., Arques, A., Vicente, R., Ballesteros Martín, M.M., Sánchez Pérez, J.A., Oller, I., Malato, S. 2009. Confirming *Pseudomonas putida* as a reliable bioassay for demonstrating biocompatibility enhancement by solar photo-oxidative processes of a biorecalcitrant effluent. *J Hazard Mater.* 162: 1223-1227.

Garmouma, M., Teil, M.J., Blanchard, M., Chevreuil, M. 1998. Spatial and temporal variations of herbicide (triazines and phenylureas) concentrations in the catchments basin of the Marne River (France). *Sci Total Environ.* 224: 93-107.

Gelbke, H.P., Kayser, M., Poole, A. 2004. OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology.* 205: 17-25.

GFEA (German Federal Environment Agency). 2004. ENDOSULFAN. Draft Dossier prepared in support of a proposal of endosulfan to be considered as a candidate for inclusion in the UN-ECE LRTAP protocol on persistent organic pollutants. German. pp 1-15.

Giesy, J.P., Hilscherova, K., Jones, P.D., Kannan, K., Machala, M. 2002. Cell bioassays for detections of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Mar. Pollut. Bull.* 45: 3-16.

Gill, W. B., Schumacher, G.F.B., Bibbo, M. 1977. Pathological semen and anatomical abnormalities of genital tract in human male subjects exposed to diethylstilbestrol in utero. *J Urol.* 117: 477-480.

Girotti, S., Ferri, E. N., Fumo, M. G., Maiolini, E. 2008. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Anal Chim Acta.* 608: 2-29.

Gleick, P.H. 1996. Water resources. In: *Encyclopedia of Climate and Weather.* S.H. Schneider (eds). Oxford University Press, New York. pp 817-823.

Glotfelty, D.E., Taylor, A.W., Isensee, A.R., Jersey, J., Glen, S. 1984. Atrazine and simazine movement to Wye River estuary. *J. Environ. Qual.* 13:115–121.

Goerlitz, G., Eyrich, U. 1987. Endosulfan adsorption/ desorption on system soil/ water. Part II: metabolites endosulfan sulphate, endosulfan-diol. *AgrEvo Doc (A 39353).*

Gorzerino, C., Quemeneur, A., Hillenweck, A., Baradat, M., Delous, G., Ollitrault, M., Azam, D., Caquet, T., Lagadic, L. 2009. Effects of diquat and fomesafen applied alone and in combination with a nonylphenol polyethoxylate adjuvant on *Lemna minor* in aquatic indoor microcosms. *Ecotox Environ Safe*. 72: 802-810.

Gourmelon, A., Ahtiainen, J. 2007. Developing Test Guidelines on invertebrate development and reproduction for assessment of chemicals, including potential endocrine active substances – The OECD perspective. *Ecotoxicology*. 16: 161-167.

Gray, L. E., Klinefelter, G., Kelce, W., Laskey, J., Ostby, J., Ewing, L. 1995. Hamster Leydig cells are less sensitive to ethane dimethanesulfonate when compared to rat Leydig cells both *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 130: 248-256.

Green, S., Water, P., Kumar, V., Krust, A., Bornet, J. M., Argos, P., Chambon, P. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: Sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320: 134-139.

Grenn, D.H. 1991. Terbutylazine. Information on the active substance. September (Ciba-Geigy Document)

Grosselin, R.E., Smith, R.P., Hodge, H.C. 1984. Clinical toxicology of commercial products. 5<sup>th</sup> edition. Williams e Wilkins (eds). Baltimore, MD. pp 5-45.

Guilhermino, L., Diamantino T.C., Silva, M.C., Soares, A.M.V.M. 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotox Environ Safe*. 38: 292-295.

Guillette, L.J. Jr., Crain, D.A. 2000. Endocrine Disrupting Contaminants: An evolutionary perspective. Philadelphia: Francis and Taylor Inc. pp. 355.

Güler, C., Thyne, G.D. 2004. Hydrologic and geologic factors controlling surface and groundwater chemistry in Indian Wells – Owens Valley area, southeastern California, USA. *J. Hydrol*. 285: 177-198.

Gunamalai, V., Kirubaragan, R., Subramoniam, T. 2004. Hormonal coordination of molting and female reproduction by ecdisteroides in the crab *Emerita asiatica* (Milne Edwards). *Gen comp Endocrinol*. 138: 128-138.

Gunningham, N., Sinclair, D. 2005. Policy instrument choice and diffuse source pollution. *J Environ Law*. 17: 51-81.

Haider, S., Imbaray, R.M. 1986. Relative Toxicity of Technical Material and Commercial Formulation of Malathion and Endosulfan to a Fresh Water Fish, *Channa punctata*. *Ecotox. Environ. Safe* 11: 347-351.

Hansen, D.J., Cripe, G.M. 1991. Interlaboratory Comparison of the Early Life Stage Toxicity Test Using Sheepshead Minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Aquatic Toxicol Risk Assess. ASTM, Mayes/Barron*. 354-375.

Harmon, M.A., Boehm, M.F., Heyman, R.A. Mangelsdorf, D.J. 1995. Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proc. Nat. Acad sci. USA*. 92: 6157-6160.

Harrison, P. T. C. 2001. Endocrine disruptors and human health. *Brit Med J*. 323: 1317-1318.

Hatch, E.E., Palmer, J.R., Noller, K.L., Kaufman, R.H., Mitendorf, R. 2001. Incidence of squamous neoplasia of the cervix and vagina in woman exposed prenatally to diethylstilbestrol (United States). *Cancer Causes Control* 12: 837-845.

Hayes, T., Haston, K., Tsiu, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. 2002. Herbicides: Feminization of male frogs in the wild. *Nature*. 419: 895-89.

Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C., Kahru, A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. 71: 1308-1316

Helena, B., Pardo, R., Vega, M., Barrado, E., Fernandez, J.M., Fernandez, L. 2000. Temporal evolution of groundwater composition in an alluvial aquifer (Pisuerga River, Spain) by principal component analysis. *Water Res*. 34: 807-816.

Henderson, B.E., Benton, B., Cosgrove, M., Baptista, J., Aldrich, J., Townsend, D., Hart, W., Mark, T.M. 1976. Urogenital abnormalities in sons of women treated with diethylstilbestrol. *Pediatrics*. 58: 505-507.

Hering, D., Johnson, R.K., Kramm, S., Schmutz, S., Szoszkiewicz, K., Verdonschot, P. F. M. 2006. Assessment of European streams with diatoms, macrophytes, macroinvertebrates and fish: a comparative metric-based analysis of organism response to stress. *Freshwater Biol.* 51: 1757-1785.

Hernando, M.D., de Vettori, S., Martínez Bueno, M.J., Fernández-Alba, A.R. 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere.* 68: 724-730.

Herrmann, M. 2003. Endosulfan preliminary dossier. Proceedings, 4<sup>th</sup> Meeting of the United Nations Economic Commission for Europe Expert group on Persistent Organic Pollutants, Oslo, Norway. pp 59-61.

Heusel, R. 1991. Endosulfan – substance, technical (Hoe 002671 00 ZD98 0005) Effect to *Daphnia magna* (waterflea) in a 21-day Reproduction Test (method OECD). AgrEvo A46561.

Hildebrandt, A., Guillamón, M., Lacorte, S., Tauler, R., Barceló, D. 2008. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and ground water quality (North Spain). *Water Res.* 42: 3315-326.

Hinck, J.E., Blazer, V.S., Denslow, N.D., Echols, K.R., Gross, T.S., May, T. W., Anderson, P.J., Coyle, J.J., Tillit, D.E. 2007. Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from the Colorado River and its tributaries. *Sci Total Environ.* 378: 376-402.

Hoback, A., Larsson, P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology.* 71: 2255- 2268.

Hoffman, D., Rattner, B., Cairns, J. 2003. Aquatic Toxicology Test Methods. In: Handbook of Ecotoxicology – Environ Chem Toxicol. W.J. Adams e C.D. Rowland (eds.), 2<sup>nd</sup> edition, Lewis Publishers. USA.

Horiguchi, T., Kojima, M., Kaya, M., Matsuo, T., Shiraishi, H., Morita, M., Adachi, Y. 2002. Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, *Haliotis gigantea*. *Marine Environ Res.* 54: 679-684.

Hosmer, A., Warren, L.W., Ward, T.J. 1998. Chronic toxicity of pulsed-dosed fenoxycarb to *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 17: 1860-1866.

Howard, P.H. 1989. Handbook of Environmental Fate and Exposure data for Organic Chemical. Pesticides. Lewis Publishers. Chelsea. pp. 8-22.

Howard, P.H. 1991. Handbook of Environmental Fate and Exposure data for Organic Chemical. Pesticides. Lewis Publishers. Chelsea. pp. 6-13.

Huber, W. 1993. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. Environ Toxicol Chem 12: 1865-1881.

Hutchinson, T.H. 2002. Reproductive and developmental effects of endocrine disruptors in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. Toxicol Lett. 131: 75-81.

Hutchinson, T.H., Brown, R., Brugger, K.E., Campbell, P.M., Holt, M., Länge, R., McCahon, P., Tattersfield, L.J., van Egmond, R. 2000. Ecological risk assessment of endocrine disruptors. Environ Health Perspect. 108: 1007-1014.

IA (Instituto do Ambiente). 2005. Relatório síntese sobre a caracterização das regiões hidrográficas previstas na Directiva Quadro da Água. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, Lisboa.

Ibrahim, W.L.F., Furu, P., Ibrahim, A. M., Christensen, N. O. 1992. Effect of the organophosphorous insecticide chlorpyrifos (Dursban), on growth, fecundity and mortality of *Biomphalaria alexandrina* and on the production of *Schistosoma mansoni cercariae* in the snail. J Helminthol. 66: 79-88.

Indarto, D., Izawa, M. 2001. Steroid hormone and endocrine disruptors: Recent advances in receptor-mediated actions. Yonago Acta Medica. 44:1-6.

Innes, D.J., Fox, C.J., Winsor, G.L., 2000. Avoiding the cost of males in obligately asexual *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera). Biol J Linn Soc. 267: 991-997.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). 2002. Introduction/Background. In: Global Assessment of the state of the science of endocrine disruptors. Terri Damstra, Sue Barlow, Aeke Bergman, Robert Kavlock, Glen van Der Kraak (eds). Washington.

Isçen, C. F., Özgür, E., İlhan, S., Aıslan, N., Yılmaz, V., Ahiska, S. 2008. Application of multivariate statistical techniques in the assessment of surface water quality in Uluabat Lake, Turkey. *Environ Monit Assess.* 144: 269-276.

Isensee, A.R. 1984. Persistence and movement of atrazine in a salt marsh sediment microecosystem. *Bull Environ Contam Toxicol.* 39: 516-523.

ISO 11348-2. 1998. International Standard for Water Quality: Determination of inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test). Part 2: method using liquid-dried bacteria. International Organization for Standardisation. Geneve, Switzerland.

ISO 6341. 1996. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) - Acute toxicity test. International Organization for Standardisation. Geneve, Switzerland.

ISO 7899-2 de 2000. Qualidade de água: Pesquisa e quantificação de enterococos fecais. Parte 2 – Método por filtração por membrana.

ISO 9308-2 de 1999. Qualidade de água: Pesquisa e quantificação de coliformes, coliformes termotolerantes e *E.Coli*. Parte 2 – Método dos Tubos Múltiplos.

Jackson, R.B., Carpenter, S.R., Dahm, C.N., McKnight, D.M., Naiman, R.J., Postel, S.L., Running, S.W. 2001. Water in a Changing World. *Issues in Ecology.* 9: 1-16.

Jeong, S.H., Kim, B.Y., Kang, H.G., Ku, H.K., Cho, J.H. 2006. Effect of chlorpyrifos-methyl on steroid and thyroid in rat F0-and F1-generations. *Toxicology* 220: 189-202.

Jobling, S.; Reynolds, T.; White, R.; Parker, M.G.; Sumpter, J.P. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect.* 103: 582-587.

Johnson, W.W., Finley, M.T. 1980. Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Department of Interior, Fish and Wildlife Services. Washington. DC. pp 6-56.

Jonsson, C.M. and Toledo, C.F. 1993. Bioaccumulation and elimination of endosulfan in the fish yellow tetra (*Hyphassobrycon bifascitus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 572-577.

Jorgenson, J.L. 2001. Aldrin and Dieldrin: a review of research on their production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology and epidemiology in the United States. *Environ Health Perspect.* 109: 113-139.

Joshi, A.G., Amminikutty, J., Rege, M.S. 1981. Chronic toxicity study of some pesticides estimating MATC for two fresh water fish. *J. Environ Biology.* 2: 43-57.

Kaiser, H.F. 1960. The application of electronic computers to factor analysis. *Educ. Psychol. Meas.* 20: 141-151.

Kalavathy, T., Mamatha, P., Screenivasula, P. 1999. Methyl farnesoate stimulates testicular growth in the freshwater crab *Oziotelphusa senex senex* fabricius. *Naturwissenschaften.* 86: 394-395.

Kampioti, A.A., Borba da Cunha A.C., López de Alda, M., Barceló, D. 2005. Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 382: 1815-1825.

Kang, H.G., Jeong, S.H., Cho, J.H., Kim, D.G., Park, J.M., Cho, M.H. 2004. Chlorpyrifos-methyl shows anti-androgenic activity without estrogenic activity in rats. *Toxicology*. 199: 219-230.

Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., Owens, W. 2003. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. *Environ Health Perspect*. 111: 1530-1549.

Kashian, D.R., Dodson, S.I. 2004. Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*. 5: 1282-1288.

Kast-Hutcheson, K., Rider, C.V., LeBlanc, G.A. 2001. The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environ Toxicol*. 20: 502-509.

Kaushik, N.K., Solomon, R., Stephenson, G., Day, K. 1985. Assessment of sublethal effects of atrazine on zooplankton. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci*. 1368: 377-379.

Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T., Tilson, H. A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S.EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*. 104: 714-740.

Kelce, W.R., Stone, C.R., Laws, S.C., Gray, L., Kemppainen, J.A., Wilson, E.M. 1995. Persistent DDT metabolite *p,p'*DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*. 375: 581-585.

Kersting, K., van Wijngaarden, R. 1992. Effects of chlorpyrifos on microecosystem. *Environ Toxicol Chem*. 11: 365-372.

Key, P., Chung, K., Siewicki, T., Fulton, M. 2007. Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Ecotox Environ Safe*. 68: 272-277.

Khangerot, B.S., Das, S. 2009. Toxicity of mercury on *in vitro* development of parthenogenetic eggs of a freshwater cladocera *Daphnia carinata*. J Hazard Mater. 161: 68-73.

Kikuchi, M., Sasaki, Y., Wakabayashi, M. 2000. Screening of Organophosphate Insecticide Pollution in water by using *Daphnia magna*. Ecotox Environ Safe. 47: 239-245.

Klaassen, C. D. 2001. Cassaret & Doull's Toxicology: The basic science of poisons. 6<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill, USA.

Kleiven, O.T., Larsson, P., Hobaek, A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos. 65: 197-206.

Knauf, W., Schulze, E. F. 1973. New findings on the toxicity of endosulfan and its metabolites to aquatic organisms. Mede. Fac. Landbouwwer Gen. 38: 717-732.

Kolpin, D.W., Barbash, J.E., Gilliom, R.J. 1998. Occurrence of pesticides in shallow groundwater of the United States: initial results from the National Water-Quality Assessment program. Environ Sci Tecnol. 32: 558-566.

Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J., Hagenmaier, H. 1999. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. Sci Total Environ. 225: 33-48.

Koukal, B., Dominik, J., Vignati, D., Arpagaus, P., Santiago, S., Ouddane, B., Benaabidate, L. 2004. Assessment of water quality and toxicity of polluted Rivers Fez and Sebou in the region of Fez (Morocco). Environ Pollut. 131: 163-172.

Kuiper, G. G. J. M., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci USA 93: 5925-5930.

Kurunc, A., Yurelli, K., Okman, C. 2006. Effects of Kilickaya Dam on concentration and load values of water quality constituents in Kelkit Stream in Turkey. J Hydrol. 317: 17-30.

Kusk, K.O., Wollenberger, L. 2007. Towards an internationally harmonised test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. *Ecotoxicology*. 16 : 183-195.

Lacorte, S., Viana, P., Guillamon, M., Tauler, R., Vinhas, T., Barceló, D. 2001. Main findings and conclusions of the implementation of Directive 76/465/CEE concerning the monitoring of organic pollutants in surface waters (Portugal, April 1999-May 2000). *J Environ. Monit.* 3: 475-482.

Larh, J., Maas-Diepeveen, J.L., Stuijzand, S.C., Leonards, P.E.G., Drüke, J.M., Lücker, S., Espeldoorn, A., Kerkum, L.C.M., van Stee, L.L.P., Hendriks, A.J. 2003. Response in sediments bioassays used in the Netherlands: can observed toxicity be explained by routinely monitored priority pollutants? *Water Res.* 37: 1691-1710.

Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. H.; Olsson, P. E., Förlin, L. 1999. Ethinyloestradiol – an undesired fish contraceptive? *Aquat Toxicol.* 45: 91-97.

Lascombe, I., Beffa, D., Rüegg, U., Tarrdellas, J., Wahli, W. 2000. Estrogenic activity assessment of environmental chemicals using in vitro assays: Identification of two new estrogenic compounds. *Environ Health Perspect.* 108: 621- 629.

Laskey, J. W., Berman, E., Ferrell, J.M. 1995. The use of cultured ovarian fragments to assess toxicant alterations in steroidogenesis in the Sprague-Dawley rat. *Reprod Toxicol.* 9: 131-141.

Latif, M., Licek, E. 2004. Toxicity assessment of wastewaters, river waters, and sediments in Austria using cost-effective microbiotests. *Environ Toxicol* 19:302-309.

Latt Phyu, Y., Warne, M. St. J., Lim, R.P. 2004. Toxicity of atrazine and molinate to the cladoceran *Daphnia carinata* and the effect of river water and bottom sediment on their bioavailability. *Arch Environ Contam Toxicol.* 46: 308-315.

Laufer H., Biggers, W. J. 2001. Unifying concepts learned from methyl farnesoate for invertebrate reproduction and post-embryonic development. *Am Zool.* 41: 442-457.

Laufer, H., Ahl, J.S.B., Sagi, A. 1993. The role of juvenile hormones in crustacean reproduction. *Am Zool.* 33: 365-374.

Laufer, H., Biggers, W.J., Ahl, J. S. B. 1998. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate. *Gen Comp Endocrinol.* 111: 113-118.

Lavado, R., Thibaut, R., Raldúa, D., Martín, R., Porte, C. 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from Ebro River. *Toxicol Appl Pharmacol.* 196: 247-257.

Laverman, A. M., Canavan, R. W., Slomp, C. P., van Cappellen, P. 2007. Potencial nitrate removal in a coastal freshwater sediment (Haringvliet Lake, The Netherlands) and response to salinization. *Water Res.* 41: 3061-3068.

LeBlanc, G.A. 2003. Endocrine toxicology. In: *Modern Toxicology*. Hodgson, E. (ed). Appleton & Lange, Stamford, CT.

LeBlanc, G.A. 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology.* 16: 61-81.

LeBlanc, G.A., Bain, L.J., Wilson, V.S. 1997. Pesticides: multiple mechanisms of desmasculinization. *Mol. Cel. Endocrinol.* 126: 1-5.

LeBlanc, G.A., Cambell, P.M., den Besten, P., Brown, R.P., Chang, E., Coats, J., deFur, P.L., Dhaldialla, T., Edwards, J., Riddiford, L.M., Simpson, M., Snell, T., Thorndyke, M., Matsumura, F. 1999. The endocrinology of invertebrates. In: *Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment*. deFur, P.L., Crane, M., Ingersoll, C., Tattersfield, L. (eds). SETAC Press, Pensacola, FL. pp 23-106.

LeBlanc, G.A., McLachlan, J.B. 1999. Molt-independent growth of *Daphnia magna* by vertebrate antiandrogen. *Environ. Toxicol. Chem.* 7: 1450-1455.

LeBlanc, G.A., Xueyan, M., Rider C.V. 2000. Embryotoxicity of the Alkylphenol degradation product 4-Nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. Environ Health Perspect. 108: 1133-1138.

Lemke, A.E. 1980. Comprehensive report. Interlaboratory comparison of acute testing set. In: Ambient water quality for Endosulfan. USEPA, Environmental Research Laboratory, Duluth, Minnesota.. Washington, DC.

Leong, K.H., Benjamin Tan, L.L., Mustafa, A. M. 2007. Contamination levels of selected organochlorine and organophosphate pesticides in the Selangor River, Malaysia between 2002 and 2003. Chemosphere. 66: 1153-1159.

Liu, C.W., Lin, K.H., Kuo, Y.M. 2003. Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a Blackfoot disease area in Taiwan. Sci. Total Environ. 313: 77-89.

Locker, C.K., Hoagland, K.D., Siegfried, B.D. 2006. Comparative sensitivity of freshwater algae to atrazine. Bull Environ Contam Toxicol. 76: 73-79.

Lopez de Alda, M. J., Barceló, D. 2001. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in wastewater. Fresenius J Anal Chem. 371: 437-447.

Lubahn, D. B., Joseph, D. R., Sar, M., Tan, J., Higgs, H. N., Larson, R. E., French, F. S., Wilson, E. M. 1988. The human androgen receptor: Complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. Mol Endocrinol. 2: 1265-1275.

Lund, S. A., Fulton, M. H., Key, P. B. 2000. The sensitivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide induced acetylcholinesterase inhibition. Aquat Toxicol. 48: 127-134.

Lyons, G. 2000. Bisphenol A. A known endocrine disruptor. World Wildlife Fund. European Toxic programme Report. WWF-UK, Godalming, UK.

Macek, K. J., Buxton, K. S., Sauter, S., Gnilka, S., Dean, J. W. 1976. Chronic toxicity of atrazine to selected aquatic invertebrates and fishes. EPA 600/76-047. Final Report. U.S. Environmental protection Agency, Duluth, MN.

Magdza, C. H. D. 1983. Toxicity of endosulfan to some aquatic organisms of southern Africa. *Zimb J. Agric. Res.* 21: 159-165.

Mak, A. S. C., Choi, C.L., Tiu, S.H.K., Hui, J.H.L., He, J.G., Tobe, S.S., Chan, S.M. 2005. Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatius*: hepatopancreas-specific expression and farnesoic acid stimulation of vitellogenin gene expression. *Mol Reprod Dev.* 70: 288-300.

Manahan, S. E. 2000. *Environmental Chemistry*. Lewis Publishers (eds). Boca Raton: CRC Press. pp 71-111.

Mankiewicz-Boczek, J., Nazęcz-Jawecki, G., Drobniewska, A., Kaza, M., Sumorok, B., Izydorczyk, K., Zalewski, M., Sawicki, J. 2008. Application of microbiotests battery for complete toxicity assessment of rivers. *Ecotox Environ Safe.* 71: 830-836.

Mariolakos, I., Fountoulis, I., Andreadakis, E., Kapourani, E. 2007. Real-time monitoring on Evrotas River (Laconia, Greece): dissolved oxygen as a critical parameter for environmental status classification and warning. *Desalination.* 213: 72-80.

Markey, C. M., Luque, E. H., Munoz de Toro, M. M., Sonnenschein, C., Soto, A. M. 2001. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod.* 65: 1215-1223.

Markey, C. M., Rubin, B. S., Soto, A. M., Sonnenschein, C. 2003. Endocrine disruptors: from wingspread to environmental development biology. *J Steroid Biochem.* 83: 235-244.

Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. 1999. Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion River (Northern Spain). 1. Three-Brood sediment chronic bioassay of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology.* 8: 97-109.

Matos, J. X., Martins, L. P. 2006. Reabilitação ambiental de áreas mineiras do sector português da Faixa Piritosa Ibérica: Estado da arte e perspectivas futuras. Boletim Geológico y Mineiro. 112: 289-304.

Mattei, D., Cataudella, S., Mancini, L., Lorenzo, T., Migliore, L. 2006. Water, Air Soil Poll. 177: 441-455.

McKenney, C. L., Celestial, D. M. 1993. Variations in larval growth and metabolism of an estuarine shrimp *Palaemonetes pugio* during toxicosis by an insect growth regulator. Comp Biochem Physiol. 105C: 239-245.

McKinlay, R., Plant, J. A., Bell, J. N. B., Voulvoulis, N. 2008. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. Environ Int. 34: 168-183.

McKinney, M.L., Schoch, R.M. 1998. Water Resources. In: Environmental Sciences – Systems and Solutions. Jones e Barlett Publishers (eds). 1<sup>st</sup> edition. United States of America. pp 281-310.

McKnight, D. 1981. Chemical and biological processes controlling the response of a freshwater ecosystem to copper stress: a field study of the CuSO<sub>4</sub> treatment of Mill Pond Reservoir, Burlington, Massachusetts. Limnol Oceanogr. 26: 518-531.

McLachan, J. A. 1993. Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobióticos. Environ Health Perspect. 101: 386-387.

McLachan, J.A. 2001. Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us About Endocrine Disrupting Chemicals. Endocrine Rev. 22: 319-341.

Meglen, R.R. 1992. Examining large databases: a chemometric approach using Principal Component Analysis. Mar. Chem. 39: 217-237.

Mendiguchía, C., Moreno, C., García-Vargas, M. 2007. Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients. Chemosphere. 69: 1509-1517.

Mendonça, E., Picado, A., Paixão, S. M., Silva, L., Cunha, M.A., Leitão, S., Moura, I., Cortez, C., Brito, F. 2009. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. *J Hazard Mater.* 163: 665-670.

Merrit, C.M., Torrentera, L., Winter, K.M., Tornehl, C.K., Girvin, K., Dodson, S. 1999. Dieldrin reduces male production and sex ratio in *Daphnia galeata mendotae*. *Toxicol Ind Health.* 15: 193-200.

Meyer, A., Sarcinelli, P., Moreira, N. E., Josino C. 1999. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à acção de disruptores endócrinos? *Cad Saúde Pública.* 15: 845-850.

Micó, C., Recatalá, L., Peris, M., Sánchez, J. 2006. Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere.* 65: 863-872.

Millie, T.A., Hersh, C.M. 1987. Statistical characterization of the atrazine-induced photosynthetic inhibition of *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyta). *Aquat Toxicol.* 10: 239-249.

Milovanovic, M. 2007. Water quality assessment and determination of pollution sources along the Axios/Vardar River, Southeastern Europe. *Desalination.* 213: 159-173

Miltner, R. J., Baker, D. B., Speth, T. F., Fronk, C. A. 1989. Treatment Seasonal pesticides in surface water. *J Am Water Works Assoc.* 81: 43-52.

Ministry of the Environment in Japan. 2004. Endocrine disrupting effects of substances. <http://www.env.go.jp/en/topic/edcs.html>, acessado em 25 Outubro de 2007.

Miyamoto, J., Burger, J. 2003. Implications of endocrine active substances for humans and wildlife. Research Triangle Park. NC: SCOPE/IUPAC.

Moller, H., Prener, A., Skakkebaek, N. E. 1996. Testicular cancer cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark. *Cancer Cause Control.* 7: 264-274.

Moore, M. T., Huggett, D. B., Gillespie, W. B. Jr., Rodgers, Jr., Cooper, C. M. 1998. Comparative toxicity of Chlordane, Chlorpyrifos and Aldicarb to four Aquatic testing organisms. *Arch Environ Contam Toxicol.* 34: 152-157.

Moorhead, D. L., Kosinski, R.,J. 1986. Effect of atrazine on the productivity of artificial stream algal communities. *Bull Environ Contam Toxicol.* 37: 330-336.

Morales, J.A. 1993. Sedimentologia del Estuário del Guadiana (SW Espana-Portugal). PhD. Thesis, University of Sevilla. Spain.

Morales, M. M., Martih, P., Lopis, A., Campos, L., Sagrado, S. 1999. An environmental study by factor analysis of surface seawater in the Gulf of Valencia (Western Mediterranean). *Anal Chim Acta.* 394: 109-117.

Mu, X., LeBlanc, G. A. 2002a. Development toxicity of testosterone in the crustacean *Daphnia magna* involves antiectodysteroidal activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 129: 127-133.

Mu, X., LeBlanc, G. A. 2002b. Environmental antiectodysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *J Exp Zool.* 292: 287-292.

Mu, X., LeBlanc, G. A. 2004. Cross communication between signalling pathways: juvenoid hormones modulate ecdysteroid activity in crustacean. *J Exp Zool.* 301A: 793-801.

Mudge, S. M., Duce, C. E. 2005. Identifying the source, transport path and sink of sewage derived organic matter. *Environ Pollut.* 136: 209-220.

Mueller, S. O. 2004. Xenoestrogens: mechanism of action and detection methods. *Anal Bioanal Chem.* 378: 582-587.

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* 403: 853-858.

Naddy, R. B., Johnson, K. A., Klaine, S. J. 2000. Response of *Daphnia magna* to pulsed exposure of chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem.* 19: 423-431.

Nagel, S. C., vom Saal, F. S., Thayer, K. A., Dhar, M. G., Boechler, M., Welshons, W. V. 1997. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ. Health Perspect.* 105: 70-76.

Nałęcz-Jawecki, G., Hajnas, A., Sawicki, J. 2007. Photodegradation and phototoxicity of thioridazine and chlorpromazine evaluated with chemical analysis and aquatic organisms. *Ecotoxicology.* 17: 13-20.

Nebeker, A. V., McCrady, J. K., Mshar, R., McAuliffe, C. K. 1983. Relative sensitivity of *Daphnia magna*, *Rainbow trout* and *Fathead minnows* to Endosulfan. *Environ Toxicol Chem.* 2: 69-72.

Nebeker, A.V. 1982. Evaluation of *Daphnia magna* renewal life-cycle test method with silver and endosulfan. *Water Res.* 16: 739-744.

Neilson, A. H., Lewin, R. A. 1974. The uptake and utilization of organic carbon by algae: An assay in comparative biochemistry. *Phycologia.* 13: 227-264.

Neto, J. M. M., Moita, G. C. 1998. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova.* 21: 467-469.

Newbold, R. 1995. Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens. *Environ Health Perspect.* 103: 83-87.

Newham, L. T. H., Letcher, R. A., Jakeman, A. J., Kobayashi, T. 2004. A framework for integrated hydrologic, sediment and nutrient export modelling for catchment-scale management. *Environ Modell Softw.* 19: 1029-1038.

Ngabè, B., Bidleman, T. F. 2001. Endosulfan in the atmosphere, review and evaluation. Report for center of coastal environmental health and biomolecular research. National Ocean Service and Atmospheric. Charleston, SC 29412, USA.

Nice, H. E., Morritt, D., Crane, M., Thorndyke, M. 2003. Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*: Possible endocrine disruption? *Marine Ecol Progr Ser.* 256: 293-300.

Nijhout, H.F. 1998. *Insect hormones*. Princeton University Press. Princeton.

NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health). 1981. Registry of toxic effects of chemical substances. Cincinnati, OH. pp 5-43.

Nollar, K. L., O'Brien, T., Colton, R., Kaufman, R., Melton, L. J. 1990. Medical and surgical diseases associated with *in utero* exposure to diethylstilboestrol. In: *Clinical practice of Gynaecology*. Nollar, K. (ed). New York. Elsevier Publishing Co. pp 1-7.

Novotny, V. 1999. Diffuse pollution from agriculture – a worldwide outlook. *Water Sci Techol.* 39: 1-13.

Nowak, B., Goodsell, A., Julli, M. 1995. Residues of endosulfan in carp as an indicator of exposure conditions. *Ecotoxicology.* 4: 363-371.

Oberdorster, E., Cheek, A.O. 2001. Gender benders at the beach: Endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environ Toxicol Chem.* 20: 23-36.

Oberlander, H., Silhacek, D.L., Leach, C.E. 1998. Interactions of ecdysteroid and juvenoid agonists in *Plodia interpunctella* (Huebner). *Arch Insect Biochem Physiol.* 38: 91-99.

Oda, S., Tatarazako, N., Dorgerloh, M., Johnson, R. D., Kusk, K. O., Leverett, D., Marchini, S., Nakari, T., Williams, T., Iguchi, T. 2007. Strain difference in sensitivity to 3,4-dichloroaniline and insect growth regulator, fenoxycarb, in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 67: 399-405.

Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., Morita, M., Iguchi, T. 2005a. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere.* 61: 1168-1174.

Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., Morita, M., Iguchi, T. 2005b. Production of male neonates in four cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog fenoxycarb. *Chemosphere*. 60: 74-78.

Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., Morita, M., Iguchi, T. 2006. Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. *Chemosphere*. 63: 1477-1484.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1998. *Daphnia magna* reproduction test. OCDE 211. Paris.

Oehlman, J., Schulte-Oehlmann, U. 2003. Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl. Chem*. 75: 2207-2218.

Oehlman, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillman, M., Market, B. 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Biphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*. 9: 383-397.

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res*. 567: 109-149.

Okamura, H., Luo, R., Aoyama, I. 1996. Ecotoxicity assessment of the aquatic environment around Lake Kojima, Japan. *Environ Toxicol Water Qual* 11: 213-221.

Olmstead, A. W., LeBlanc, G. A. 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*. 8: 2107-2113.

Olmstead, A. W., LeBlanc, G. A. 2002. Juvenoid hormone methylfarnesoate is a sex determinant in crustacean *Daphnia magna*. *J Exp Zool*. 293: 736-739.

Olmstead, A. W., LeBlanc, G. A. 2003. Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*. *Environ Health Perspect*. 111: 919-924.

Otto, M. 1998. Multivariate Methods. In: Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Winder, H.M. (eds). *Analytical Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim.

Ouyang, Y., Nkedi-Kizza, P., Wu, Q. T., Huang, C. H. 2006. Assessment of seasonal variations in surface water quality. *Water Res.* 40: 3800-3810.

Ozmen, M., Ayas, Z., Güngördu, A., Ekmekci, G. F., Yerli, S. 2008. Ecotoxicological assessment of water pollution in Sariyar Dam Lake, Turkey. *Ecotox Environ Safe.* 70: 163-173.

Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A. M., Poulsen, V., Jourdain, M. J., Férad, J. F., Grand, C., Bispo, A. 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci Total Environ.* 363: 114-125.

Pape-Lindstrom, P. A., Lydy, M. J. 1997. Synergistic toxicity of atrazine and organophosphate insecticides contravenes the response addition mixture model. *Environ Toxicol Chem.* 16: 2415-2420.

Parr, L. B., Mason, C. F. 2003. Long-term trends in water quality and their impact on macroinvertebrate assemblages in eutrophic lowland rivers. *Water Res.* 37: 2969-2979.

Pellacani, C., Buschini, A., Furlini, M., Poli, P., Rossi, C. 2006. A battery of *in vivo* and *in vitro* tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquat Toxicol.* 77: 1-10.

Personne, G. 1999. THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup> - Crustacean toxicity screening test for Freshwater. Standard Operational Procedure. Belgium. pp 3-21.

Peter, O., Lin, K. C., Karen, P., Joe, A. 2002. Persistent Organic Pollutants (POPs) and Human Health. World Federation of Public Health Association Publications, Washington, DC, USA. pp 1-35.

Peterson, J. K., Kashian, D. R., Dodson, S.I., 2001. Methoprene and 20-OH-ecdysone affect male production in *Daphnia pulex*. *Environ Toxicol Chem.* 3: 582-588.

Pfeuffer, R. J., Rand, G. M. 2004. South Florida ambient pesticides monitoring program. *Ecotoxicology.* 13: 195-205.

Pott, E. 1982. Experimental investigation of the effect of herbicides on the food uptake of *Daphnia pulicaria*. Arch Hydrobiol. 59: 330-358.

Premazzi, G., Stecchi, R. 1990. Evaluation of impact of atrazine on the aquatic environment. EU 12569. Review. Commission of the European Communities. Brussels, Belgium.

PROCESL. 2003. Estudo da situação das Fontes de poluição urbana, na bacia hidrográfica da barragem de Pedrógão: Relatório final. EDIA.

Quintana, J., Martí, I., Ventura, F. 2001. Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. J Chromatogr A. 938: 3-13.

R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Racke, D. D. 1992. Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices. In: Chemistry, Fate and Effects. Chambers JE, Levi PE (eds). Academic San Diego, CA, USA. pp 47-78.

Racke, K. D. 1993. Environmental fate of chlorpyrifos. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 131: 1-150.

Ramos, C., Carbonell, G., García Baudín, J. M. Tarazona, J. V. 2000. Ecological risk assessment of pesticides in the Mediterranean region. The need for crop-specific scenarios. Sci Total Environ. 247: 269-278.

Reddy, P. S., Ramamurthi, R. 1998. Methyl farnesoate stimulates ovarian maturation in freshwater crab *Oziotelphusa senex*. Curr Sci. 74: 68-70.

Reeder, A., Ruiz, M. O., Pessier, A., Brown, L. E., Levenson, J. M., Phillips, C. A. Wheeler, M. B., Warner, R. E., Beasley, V. R. 2005. Intersexuality and the cricket frog decline: Historic and geographic trends. Environ Health Perspec. 113: 261-265.

Reeves, R. L., Grant, S. B., Morse, R. D., Copil Oancea, C. M., Sanders, B. F., Boehm, A. B. 2004. Scaling and management of fecal indicator bacteria in runoff from a coastal urban watershed in southern California. *Environ Sci Technol.* 38: 2637-2648.

Restifo, L. L., Thomas, G. W. 1998. A juvenile hormone agonist reveals distinct developmental pathways mediated by ecdysone-inducible broad complex transcription factors. *Dev Gen.* 22: 141-159.

Richerson, P. J., Lopez, M., Coon, T. 1978. The deep chlorophyll maximum layer of Lake Tahoe. *Verh. Int Ver Limnol.* 20: 426-433.

Riddiford, L. M. 1985. Hormone action at the cellular level. In: *Comprehensive insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (eds.). Pergamon press, Oxford. pp 37-84.

Rider, C. V., Gorr, T. A., Olmeastead, A. W., Wasilak, B. A. LeBlanc, G.A. 2005. Stress signalling: co-regulation of hemoglobin and male sex determination through a terpenoid signaling pathway in a crustacean. *J Exp Biol.* 208: 15-23.

Rocha, C., Galvão, H., Barbosa, A. 2002. Role of transient silicon limitation in the development of cyanobacteria blooms in the Guadiana estuary, south-western Iberia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 228: 35-45.

Rodrigues-Moraz, S., López de Alda, M. J., Barceló, D. 2004. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1045: 85-92.

Rodrigues-Moraz, S., López de Alda, M., Barceló, D. 2006. Fast and simultaneous monitoring of organic pollutants in a drinking water treatment plant by a multi-analyte biosensor followed by LC-MS validation. *Talanta.* 69: 377-384.

Rodríguez, E. M., Medesani, D. A., Fingerman M. 2007. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. *Comp. Biochem. Physiol.* 146: 661-671.

Rodriguez, P., Martinez-Madrid, M., Cid, A. 2006. Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* straus. *Ecotoxicology*. 15: 559-572.

Rose, R.M., Warne, M.St.J., Lim, R.P. 2001. The presence of chemicals exuded by fish affects the life-history response of *Ceriodaphnia cf. dubia* to chemicals with different mechanisms of action. *Environ Toxicol Chem*. 20: 2892-2898.

Rosenberg, D.M., Resh, V.H. 1993. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates . Chapman e Hall, New York.

Rouvalis, A., Karadima, C., Zioris, I. V., Sakkas, V. A., Albanis, T., Iliopoulou-Georgudaki, J. 2009. Determination of pesticides and toxic potency of rainwater samples in western Greece. *Ecotox Environ Safe*. 72: 828-833.

Rozati, R., Reddy, P. P., Reddanna, P., Mujtaba, R. 2002. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil Steril*. 78: 1187-1194.

RSCIS (Royal Society of Chemistry Information Services). 1991. The Agrochemicals Handbook. (3ª eds). Kidd, H; James, D.R. (eds.). Cambridge, UK. pp 5-13.

Safe, S. 2002. Environmental estrogens: roles in male reproductive tract problems and in breast cancer. *Rev Environ Health*. 17: 253-262.

Sánchez-Fortún, S., Barahona, M. V. 2005. Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. *Chemosphere* 59: 553-559.

Santos Oliveira, J.M., Farinha, J., Matos, J.X., Ávila, P., Rosa, C., Canto Machado, M.J., Daniel, E.S., Martins, L., Machado Leite, M.R. (2002). Diagnóstico ambiental das principais áreas mineiras degradadas do País. *Boletim de Minas*. 39, 67-85.

Schimmel, S. C., Garnas, R. L., Patrick, J. M., Moore, J. C 1983. Acute toxicity, bioconcentration and persistence of AC 222.75, benthocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methyl parathion, and permethrin in the estuarine environment. *J Agric Food Chem.* 31: 104-113.

Schoumans, O. F., Groenendijk, P. 2000. Modeling soil phosphorus levels and phosphorus leaching from agricultural lands in the Netherlands. *J Environ Qual.* 29: 111-116.

Schuurman, H. J., Kranjc-Franken, M. A. M., Kuper C. F.; van Loveren, H., Vos J. G. 1991. Immune System. In: *Handbook of Toxicology Pathology*. Haschek, W.M. Rousseaux, S. (eds). New York: Academic Press. pp. 427-487.

SEIA (Sociedade de Engenharia e Inovação Ambiental S.A.). 1995. *Estudo Integrado de Impacte Ambiental do Empreendimento de Alqueva. Volume V.*

Sharpe, R. M., Skakkebaek, N. E. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-1395.

Sharpley, A. N. 1993. An innovative approach to estimate bioavailable phosphorus in agricultural runoff using iron-oxide impregnated paper. *J Environ Qual.* 22: 597-601.

Shcherban, E. P. 1972. Effects of low concentrations of pesticides on the development of some Cladocera and the abundance of their progeny. *Hidrobiol J.* 6: 85-89.

Sherstha, S., Kazama, F. 2007. Assessment of surface water quality using multivariate statistical techniques: A case study of the Fuji river basin, Japan. *Environ Model Softw.* 22: 464-475.

Shivaramaiah, H.M., Sanchez-Bayo, F., Al-Rifai, J., Kennedy, I.R. 2005. The fate of endosulfan in water. *J Environ Sci Health Part B.* 40: 711-720.

Siefert, R. E. 1984. Effects of Dursban (chlorpyrifos) on non-target aquatic organisms in a natural pond undergoing mosquito control treatment. Progress report. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth.

Silva, E. Rajapakse, N., Kortenkamp, A. 2002. Something from “nothing” – 8 weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol.* 36: 1751-1756.

Simard, R. R., Beauchemin, S., Haygarth, P. M. 2000. Potential for preferential pathways of phosphorus transport. *J Environ Qual.* 29: 97-105.

Simeonov, V., Simeonova, P., Tsitouridou, R. 2004. Chemometric quality assessment of surface water: two case studies. *Chem. Eng. Ecol.* 11: 449-469.

Simeonova, P., Simeonov, V., Andreev, G. 2003. Environmetric analysis of the Struma River water quality. *Cent. Eur J Chem.* 2: 121-126.

Singh, K. P., Malik, A., Sinha, S. 2005. Water quality assessment and apportionment of pollution sources of Gomti River (India) using multivariate statistical techniques: a case study. *Anal Chim Acta.* 538: 355-374.

Singh, K.P., Malik, A., Mohan, D., Sinha, S. 2004. Multivariate statistical techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality of Gomti River (India): a case study. *Water Res.* 38: 3980-3992.

Singleton, D. W., Khan, S. A. 2003. Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. *Front Biosci.* 1: 110-118.

Slobodkin, L. B. 1954. Population dynamics in *Daphnia obtuse*. *Kurz. Ecol. Monogr.* 24: 69-88.

Smith, A. G. 1991. Chlorinated Hydrocarbon Insecticides. In: *Handbook of Pesticides Toxicology*. Hayes, W. J., Jr.; Laws, E. R., Jr. (eds.). New York.

Soares, A.M.V.M. 1989. Clonal variation in life-history traits in *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). Implications for ecotoxicology. Tese de Doutorado. Department of Animal and Plant Sciences, University of Sheffield. pp 162.

Sobral, O., Chastinet, C., Nogueira, A., Soares, A.M.V.M., Gonçalves, F., Ribeiro, R. 2001. *In vitro* development of parthenogenetic eggs: A fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*. *Ecotox Environ Safe*. 50: 174-179.

Sokal, R. R., Rohlf, F. J. 1995. *Biometry - The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3<sup>rd</sup> ed. W.H. Freeman and Company. New York.

Soldán, P. 2003. Toxic risk of surface water pollution – six years of experience. *Environ Int*. 28: 677-682.

Solomon, K. R., Baker, D. B., Richards, R. P., Dixon, K. R., Klaine, S. J., LaPoint, T. W., Kendall, R. J., Weisskopf, C. P., Giddings, J. M., Giesy, J. P., Hall, L. W. Jr, Williams, W. M. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem* 15: 31-76.

Somasundaram M. L., Coats, J. R., Racke, K. D., Stahr, H. M. 1990. Application of the microtox system to assess the toxicity of pesticides and their hydrolysis metabolites. *Bull Environ Contam Toxicol*. 44: 254-259

Sotero-Santos, R. B., Rocha, O., Povinelli, J. 2005. Evaluation of water treatment sludge's toxicity using the *Daphnia* bioassay. *Water Res*. 39: 3909-3917.

Soto, A.M, Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect*. 103: 113-122.

Souty, C., Besse, G., Picaud, J.L. 1982. Ecdysone stimulates the rate of vitellogenin release in hemolymph of the terrestrial crustacean isopoda *Porcellio dilatatus*. *C R Acad Sci Ser III*. 294: 1057-1059.

STATISTICA (data analysis software system), 2001. Version 6. Statsoft, Inc. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)

Stein, J. R. 1973. Handbook of Phycological Methods, culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, London. pp 524

Stevens, J. T., Sumner, D. D. 1991. Herbicides. In: Handbook of pesticides toxicology. Hayes, W.J.Jr, Laws, E.R. (eds). Academic Press. New York. pp 8-14.

Stewart, P. W., Reihman, J., Lonky, E. I., Darvill, T. J., Pagano, J. 2003. Cognitive development in preschool children prenatally exposed to PCBs and MeHg. Neurotoxicol Teratol. 25:11-22.

Stoeckel, J. A., González, M. J., Oris, J. T., Kovach, M. J., Mace, K. M. 2008. Atrazine and increased male production by *Daphnia*: The importance of combining field and laboratory approaches. Environ Toxicol Chem. 11: 2352-2360.

Strachan, G., Preston, S., Maciel, H., Porter, A. J. R., Paton, G. I. 2001. Use of Bacterial biosensors to interpret the toxicity and mixture toxicity of herbicides in freshwater. Water Res. 35: 3490-3495.

Streit, B., Peter, H.M. 1978. Long-term effects of atrazine to selected freshwater invertebrates. Arch hydrobiol. 55: 62-77.

Subramoniam, T. 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. Comp. Biochem. Physiol. C125: 135-156.

Sunderam, R. I. M., Thompson, G. B., Chapman, J. C., Cheng, D. M. H. 1994. Acute and chronic toxicity of endosulfan to two Australian cladocerans and their applicability in deriving water quality criteria. Arch Environ Contam Toxicol. 27: 541-545.

Sved, D., Drottar, K. R., Sweigert, J., Smith, G. J. 1993. Chlorpyrifos: a flow-through life-cycle toxicity test with the saltwater mysid (*Mysidopsis bahia*). Report DECO-ES-2506. DowElanco, Indianapolis.

Tabata, A., Miyamoto, N., Ohnishi, Y., Itoh, M., Yamada, T., Kamei, T., Magara, Y. 2003. The effect of chlorination of estrogenic chemicals on the level of serum vitellogenin of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Water Sci Technol. 47: 51-57.

Tabira, Y., Nakai, M., Asai, D., Yakabe, Y., Tahara, Y., Nogushi, M., Takatsuki, M., Shimohigashi, Y. 1999. Structural requirements of para-alkylphenols to bind estrogen receptor. *Eur J Biochem.* 262: 240-245.

Takenaka, R. A., Sotero-Santos, R. B., Rocha, O. 2006. Water quality assessment by ecotoxicological and limnological methods in water supplies, Southeast Brazil. *Ecotoxicology.* 15: 73-82.

Tatarazako, N., Oda, S. 2007. The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology.* 16: 197-203.

Tatarazako, N., Oda, S., Watanabe, H., Morita, M., Iguchi, T. 2003. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere.* 53: 827-833.

Tatarazako, N., Oda, S., Watanabe, H., Morita, M., Iguchi, T. 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). *Environ Sci.* 17: 439-449.

Tauler, A., Lacorte, S., Guillamón, M., Cespedes, R., Viana, P., Barceló D. 2004. Chemometric modeling of main contamination sources in surface water of Portugal. *Environ Toxicol Chem.* 23: 565-575.

Tchounwoul, P. B., Wilson, B., Ishaque, A., Ransome, R., Huang, M. J., Leszczynski, J. 2000. Toxicity assessment of atrazine and related triazine compounds in the microtox assay, and computational modeling for their structure-activity relationship. *Int J Mol Sci.* 1: 63-74.

Telišman, S., Cvitković, P., Jurasović, P., Gavella, A., Ročić, M. 2000. Semen quality and reproductive endocrine function relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc and copper in men. *Environ Health Perspect.* 108: 45-53.

Terceiro, P., Lobo-Ferreira, J.P., Leitão, T.E. 2008. Análise da qualidade da água e questões de governância na Albufeira do Alqueva. Comunicação apresentada no 9º Congresso da Água – Água: desafios de hoje, exigências de amanhã. Cascais, Portugal.<http://www.aprh.pt/congressoagua2008/PDF/Lobo-FerreiraAlqueva.pdf>, acessado em 20 Janeiro de 2009.

Thornton, J., Steel, A., Rast, W. 1996. Reservoirs. In: Water Quality Assessment – A guide to use biota, sediments and water in environmental monitoring. Chapman, D. (eds.). 2<sup>nd</sup> edition. London

Tomlin, C. 1994. The pesticides Manual. British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry. 10<sup>th</sup> edition. United Kingdom.

Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwerman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J., Jegou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Muller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R.; Sumpter, J., Skakkebaek, N. E. 1996. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. *Environ Health Perspect.* 104: 741-803.

Townsend, C. R., Downes, B. J., Peacock, K., Arbuckle, C. J. 2004. Scale and the detection of land-use effects on morphology, vegetation and macroinvertebrate communities of grassland streams. *Freshwater Biol.* 49: 448-462.

Truman, J. W., Riddiford, L. M. 2002. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 467-500.

USEPA (Environmental Protection Agency). 1997. Special report on endocrine disruption. An effect assessment and analysis. Washington, DC. Report number EPA/630/R-96/012.

USEPA (US Environmental Protection Agency). 1986. Ambient and Water Quality criteria for Chlorpyrifos. Washington, DC. pp 5-50.

USEPA (US Environmental Protection Agency). 1989. Registration Standard for the preregistration of pesticides products containing Chlorpyrifos. Washington, DC. pp 5-44.

USEPA (US Environmental Protection Agency). 1992. Introduction to water quality based toxics control for the NPDES program. Washington, DC. pp 1-9.

USNLM (US National Library of Medicine). 1995. Hazardous Substances DataBank. Bethesda, MD. pp 6-18.

USPHS (US Public Health Services) 1995. Hazardous Substances Data Bank. Washington, DC. pp. 5-9.

Valiela, L., Tomasky, G., Hauxwell, J., Cole, M. L., Cebrian, J., Kroeger, K. D. 2000. Operationalizing sustainability: management and risk assessment of land-rived nitrogen loads to estuaries. *Ecol Appl.* 10: 1006-1023.

van Der Hoeven, N., Gerritsen, A.M. 1997. Effects of chlorpyrifos on individuals and populations of *Daphnia pulex* in the laboratory and field. *Environ Toxicol Chem.* 16: 2438-2447.

van Donk, E., Abdel-Hamid, M. I., Faafeng, B. A., Kallqvist, T. 1992. Effects of Dursban 4E and its carrier on three algal species during exponential and P-limit growth. *Aquat Toxicol.* 23: 181-192.

van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M. 2008. A stress ecology framework for comprehensive risk assessment of diffuse pollution. *Sci Total Environ.* 406: 479-483.

Vargas, V.M.F., Migliavacca, R.C.H., Terra, N.R. 2008. Comparative temporal ecotoxicological study in a river basin influenced by petrochemical industries. *Sci Total Environ.* 392:79-92.

Vega, M., Pardo, R., Barrado, E., Debán, L. 1998. Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. *Water Res.* 32: 3581-3592.

Veiga da Cunha, L., Santos Gonçalves, A., Alves de Figueiredo, V., Lino, M. 1980. Bases de Gestão de Recursos Hídricos. In: *A Gestão da Água – Princípios Fundamentais e sua Aplicação em Portugal*. Fundação Calouste Gulbenkian. pp 7-60.

Verslycke, T. A., Ghekiere, A., Raimondo, S., Janssen, C. 2007. Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology*. 16: 205-219.

Vikaskumar, G. S., Dunstan, R. H., Geary, P. M., Geary, P. M., Coombes, P., Roberts T.K., Rothkirch, T. 2007. Comparisons of water quality parameters from diverse catchments during dry periods and following rain events. *Water Res.* 41: 3655-3666.

Villeneuve, D. L., Blankenship, A. L., Giesy, J. P. 1998. Interactions between environmental xenobióticos and estrogen receptor – mediated responses. In: *Toxicant-Receptor Interactions*. Denison MS, Helferich WG. (eds.). Taylor and Francis, Philadelphia, PA, USA. pp 69-99.

Vitousek, P. M., Aber, J., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H., Tilman, G. D. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Issues in Ecology*. Number 1.

vom Saal, F. S., Timms, B. G., Montano, M. M., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Ganjam, V. K., Parmigiani, S., Welshons, W. V. 1997. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Nat Acad Sci USA*. 94: 2056-2061.

Wan, M. T., Kuo, J., Buday, C., Schroeder, G., van Aggelen, G., Pasternak, J. 2005. Toxicity of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, ( $\alpha + \beta$ )-endosulfan and their formulated and degradation products to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kisutch*, and biological implications in streams. *Environ Toxicol Chem*. 24: 1146-1154.

Wang, H. Y., Olmstead, A. W., Li, H., LeBlanc, G. A. 2005. The screening of chemicals for juvenoid-related endocrine activity using the water flea *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol*. 74: 193-204.

Ward, G. S., Ballantine, L. 1985. Acute and chronic toxicity of atrazine to estuarine fauna. *Estuaries*. 8: 22-27.

Wenning R., Erickson, G. A. 1994. Interpretation and analysis of complex environmental data using chemometric methods. *Trends Anal Chem.* 13: 446-457.

Wetzel, R. G. 1993. A água como substância. In: *Limonologia*. Fundação Calouste Gulbenkian. 2ª edição. Lisboa. pp 9-18.

Wetzel, R. G. 2001. *Limnology: Lakes and Reservoirs*. 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press.

Wharfe, J., Adams, W., Apitz, S.E., Barra, R., Bridges, T.S., Hickey, C. Ireland S. 2007. *In situ* methods of measurement—an important line of evidence in the environmental risk framework. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3: 268–274.

Whitehead, P. 1992. Examples of recent models in environmental impact assessment. *J Inst Water Environ Manag.* 6:475-484.

Wiessner, W. 1962. Inorganic micronutrients. In: *Physiology and Biochemistry of Algae*. Lewin R.A. (ed). New York, Academic Press. pp. 267-286.

Williams, T. P., Bubb, J. M., Lester, J. N. 1994. Metal accumulation within salt march environments: a review. *Marine Pollut Bull.* 28: 277-290.

Wilson, E. O. 1999. *The diversity of life*. Penguin, London. pp 406.

Wingspread Conference. 1991. Statement from the work session on chemically-induced alterations in sexual development. In: *The wildlife/human connection*. Colborn, T., Clement C. (eds). Princeton scientific publishing Co., Inc. Princeton, New Jersey. pp 1-8.

Wirth, E. F., Lund, S. A., Fulton, M. H., Scott, G. I. 2001. Determination of acute mortality in adults and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfan and methoprene exposure. *Aquat Toxicol.* 53: 9-18.

Wong, C., Kelce, W. R., Sar, M., Wilson, E. M. 1995. Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J Biol Chem.* 270: 19998-20003.

Wunderlin, D. A., Díaz, M. P., Amé, M. V., Pesce, S. F., Hued, A. C., Bistoni, M. A. 2001. Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality. A case study: Suquía River Basin (Córdoba-Argentina). *Water Res.* 35: 2881-2894.

WWFN (World Wide Fund for Nature). 1995. Case-study on the proposed dams scheme of Alqueva, Portugal. Update of 1992 Report.

Yidana, S. M., Ophori, D., Banoeng-Yakubo, B. 2008. A multivariate statistical analysis of surface water chemistry data – The Ankobra Basin, Ghana. *J Environ Manage.* 86: 80-87.

Yidana, S. M., Ophori, D., Banoeng-Yakubo, B., 2008. A multivariate statistical analysis of surface water chemistry data – The Ankobra Basin, Ghana. *J Environ Manage.* 86: 80-87.

Yoo, J. Y., Solomon, K. R. 1981. Persistence of permethrin, atrazina and metoxychlor in a natural lake system. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci.* 1151: 164-167.

Zalizniak L., Nugegoda, D. 2006. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotox Environ Safe.* 64: 207-214.

Zar, J. H. 1996. Biostatistical analysis. 3<sup>rd</sup> edition. Prentice-Hall International, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.

Zhang, L., Gibble, R., Baer, K. N. 2003. The effects of 4-nonyphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*. *Ecotox Environ Safe.* 55: 330-337.

Zou, E., Fingerman M. 2003. Endocrine disruption of sexual development, reproduction and growth by environmental organic contaminants: current perspectives. *Curr Top Pharmacol.* 7: 69-80.

Zou, E., Fingerman, M. 1997. Synthetic Estrogenic agents do not interfere with sex differentiation but do inhibit moulting of the cladoceran *Daphnia magna*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 58: 596-602.