



Avaliação de Risco de Fungicidas para os Organismos Aquáticos - Representatividade da Sensibilidade das Espécies Padrão para Outras Espécies Aquáticas Não-Visadas

Joana Raquel Bispo Bernardino

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente – Tecnologias Ambientais

Orientador: Doutor Michiel Adriaan Daam

Coorientadora: Doutora Maria José Antão Pais de Almeida Cerejeira

Júri:

Presidente: Doutora Elizabeth Costa Neves Fernandes de Almeida Duarte, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: - Doutor Michiel Adriaan Daam, orientador;

-Mestre Emília Cardoso Moura da Silva, Técnica Superior do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Lisboa, 2013

Agradecimentos

Ao Dr. Michiel Daam, meu orientador e que em muito me ajudou, agradeço por todo o apoio, dedicação, paciência e disponibilidade, sem a sua ajuda este trabalho não seria possível.

À minha co-orientadora, Dra. Maria José Cerejeira, pela ajuda e apoio ao longo deste trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos e por me ajudarem e apoiarem em tudo, obrigada também pela enorme paciência e por todo o carinho que sempre me deram.

A toda a minha família por terem sempre uma palavra de carinho e de apoio.

Aos meus amigos, tanto os de infância como aos que conheci ao longo do curso, por estarem sempre lá para ajudar, por me fazerem rir, por serem os melhores amigos que se pode ter. Todos foram e serão sempre importantes ao longo da minha vida no entanto, é impossível não destacar algumas pessoas muito especiais e por quem tenho um enorme carinho, a Sofia por teres toda a paciência comigo e me dares força, o Valter por seres aquela pessoa que me anima e me atura à vinte anos, à Telma e a Ângela agradeço por todo o companheirismo ao longo destes seis anos e toda a amizade, e por último mas não menos importante à Liliana que durante estes seis anos sempre foste uma amiga excepcional e sempre me ajudaste em tudo. O meu muito obrigado a todos.

Resumo

Estudos com inseticidas e herbicidas demonstraram que as curvas SSD (Distribuição de Sensibilidade das Espécies), baseadas nos grupos taxonómicos mais sensíveis, podem ser usadas para determinar os valores das concentrações que protegem todas as espécies. Assim, os objetivos deste estudo consistiram em verificar quais os grupos taxonómicos mais sensíveis para fungicidas, se as espécies padrão são representativas e se protegem todas as outras espécies, no âmbito da avaliação de risco ambiental de fungicidas para ecossistemas aquáticos.

Foram utilizados dados de toxicidade aguda e crónica de 86 fungicidas, calcularam-se as tolerâncias relativas (Trel) e agruparam-se os dados em crustáceos, peixes, produtores primários e invertebrados. A partir dos valores de Trel elaboraram-se as curvas SSD. Simultaneamente à divisão em grupos taxonómicos, os dados foram organizados por modo de ação (MOA) e elaboradas as curvas SSD, sabendo-se, assim, quais as espécies mais sensíveis para cada um dos MOA dos fungicidas considerados.

Com este estudo, concluiu-se que o MOA dos fungicidas tem influência na identificação do grupo taxonómico mais sensível. Pelas curvas SSD obtidas, constatou-se ainda que, para os dados de toxicidade aguda e para a maioria dos MOA de fungicidas, o grupo taxonómico mais sensível é o dos produtores primários.

Palavras-chave: Avaliação de risco ambiental; distribuição de sensibilidades das espécies; fungicidas; modos de ação.

Abstract

Studies done with insecticides and herbicides show that SSD (Species Sensitivity Distribution) curves based on more sensitive taxonomic groups can be used to determine the environmental quality limits for species protection. The main objective of this study was to verify the relative sensitivities of taxonomic groups towards fungicides' with different modes of action (MOA), and which species are the most appropriate to use as standard test species for fungicides in the context of environmental risk assessment of fungicides to aquatic ecosystems. Data could be collected for 86 different fungicides, for which Trel (relative tolerance) values were calculated. Data was divided according to the taxonomic groups: crustaceans, fish, primary producers and invertebrates, and the SSD curves were constructed using the calculated Trel values. Simultaneously with this taxonomic group division, the data of the 86 fungicides were also grouped by MOA, thus obtaining the information of which the most sensitive species for each mode of action for fungicides.

It concluded that for most of MOAs, the most sensitive taxonomic group is the primary producers. It was hence concluded that the MOA of fungicides has an influence on the identification of the most sensitive taxonomic group.

Key words: Environmental Risk Assessment, Species Sensitivity Distribution, Fungicides, Modes of Action

Extended Abstract

Despite the fact that fungicides have been used in agriculture for decades and that they have been reported to pollute surface waters, there is a relatively limited amount of data available on their side-effects on non-target organisms in the aquatic environment.

The most common existing data on the effects of fungicides on organisms is obtained through laboratory toxicity tests, where organisms are exposed to different conditions, which seek to copy the natural environment. The response of the organisms is used to assess the negative, lethal and sub lethal effects of these fungicides.

On the ecotoxicological evaluation, the scientific development must be taken into account, as well as all biological data and available information important to the ecotoxicological profiling of the active substance. The potentially negative effects observed during the ecotoxicological routine studies should also be taken into account.

Available ecotoxicological tests on aquatic organisms vary in complexity, ranging from bioassays to complex field studies. In laboratory bioassays, only a selection of standard test species is used as representatives of different trophic levels. However, the drawbacks of this method include the lack of ecological realism and the limited number of species tested.

Other tests that may be carried out in a higher-tier pesticide risk assessment use ecosystem models (microcosms and mesocosms). Model ecosystem experiments allow for replication, are easily manageable and provide ecological realism, therefore being considered as a bridge between bioassays and field studies.

The risk assessment process for fungicides in Europe recurs to ecotoxicity studies that vary in complexity, from laboratory bioassays (single species tests) to field studies. Extrapolating data derived from selected standard test species to all the species that could potentially be exposed to a fungicide is highly uncertain and particularly problematic when dealing with a fungicide with a wide spectrum activity. One approach to reduce such uncertainty is to use species sensitivity distribution (SSD) curves, i.e. by incorporating toxicity data of non-standard test species.

Previous studies done with insecticides and herbicides demonstrate that SSD curves, based on more sensitive taxonomic groups can be used to determine the concentration values that protect x% of the species assemblages (hazard concentration HC_x). Based on their mode of action, it is evident that the taxonomic groups most sensitive to insecticides and herbicides are usually crustaceans and primary producers, respectively. However, the

same does not apply to fungicides, for which it is presently not clear which of the aquatic taxonomic groups (vertebrates (fish), invertebrates or primary producers) used in the environmental risk assessments for pesticides, should be the focus of attention. Our hypothesis was that the most sensitive group could be different depending on the toxic mode of action of fungicides.

The main objectives of this study were: a) to verify the relative sensitivities of the taxonomic groups for different modes of action of fungicides, and b) to assess whether the standard test species currently required for the environmental risk assessment of fungicides are sufficient or whether additional test species are required

From this investigation we can conclude:

- The fungicides' mode of action has an influence on which is the most sensitive taxonomic group
 - For the acute toxicity data, and for the majority of the fungicides' modes of action, the taxonomic group that presents the greatest sensitivity is the primary producers, however, modes of action A, B and "non-EBDC" are exceptions.
 - For mode of action A (*nucleic acids synthesis*), the most sensitive taxonomic group is the crustaceans, for mode of action B (*mitosis and cells division*) it is the fish, and for the non-EBDC group it is the invertebrates.
 - The standard species *Pseudokirchneriella subcapitata* is not representative of the taxonomic group for modes of action B (*mitosis and cells division*), G (*sterol biosynthesis in membranes*) and non-EBDC, as the PAF (Potentially Affected Fraction) value is greater than 40% for any of them.
 - The standard species also turned out to not be a good standard species for the modes of action A (*nucleic acids synthesis*), D (*amino acids and protein synthesis*), E (*signal transduction*) and G (*sterol biosynthesis in membranes*), as it always generated a PAF value greater than 40%.

Índice

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Extended Abstract.....	iii
Lista de Figuras e Quadros	vi
Lista de Acrónimos e Siglas	vii
1. Introdução.....	1
2 Avaliação Prospectiva de Risco Ambiental em Ecossistemas Aquáticos	3
2.1 Procedimentos de Avaliação de Risco Ambiental em Ecossistemas Aquáticos.....	5
2.2 Espécies a utilizar como espécies representativas dos grupos taxonómicos na avaliação de risco ambiental em ecossistemas aquáticos	9
3. <i>Risk Assessment of Fungicides to Aquatic Organisms- Representativeness of Standard Species Sensitivity for Other Non-Target Aquatic Species</i>	13
3.1 <i>Abstract</i>	13
3.2 <i>Introduction</i>	14
3.3 <i>Materials and Methods</i>	16
3.3.1 <i>Relative Tolerance Calculation</i>	17
3.3.2 <i>Construction of the SSD curves</i>	18
3.4 <i>Results and Discussion</i>	20
3.5 <i>Conclusions</i>	26
3.6 <i>References</i>	27
4. Conclusões.....	29
Referências Bibliográficas	30

Lista de Figuras e Quadros

Quadro 1- Produtos para proteção de plantas vendidos em Portugal no ano de 2008 (Adaptado de Daam et al. 2009)	1
Quadro 2- Critérios de seleção utilizados na toxicidade aguda e crónica (Adaptado de Van den Brink et al., 2006)	17
Quadro 3- Fungidas utilizados neste estudo ordenados segundo o modo de ação, e relativos aos dados de toxicidade aguda.....	19
Quadro 4- Valores de PAF (fração potencialmente afetada).....	25
Figura 1- Esquema da abordagem por níveis para a avaliação do efeito dos pesticidas (Adaptado de Brock e Van Wijngaarden, 2012)	4
Figura 2- Curvas de distribuição de sensibilidade das espécies baseadas em valores de toxicidade aguda.....	20
Figura 3- Curvas de distribuição de sensibilidade das espécies baseadas em valores de toxicidade aguda para o modo de acção A (<i>nucleic acids synthesis</i>).....	21
Figura 4- Curvas de distribuição de sensibilidade das espécies baseadas em valores de toxicidade aguda para o modo de acção F (<i>lipid synthesis and membrane integrity</i>).....	22
Figura 5- Curvas de distribuição de sensibilidade das espécies baseadas em valores de toxicidade aguda para o modo de acção EBDC (<i>multi-site contact activity whose compound are: mancozeb, maneb, metiram, naba m or zineb</i>).....	23
Figura 6- Curvas de distribuição de sensibilidade das espécies baseadas em valores de toxicidade aguda para o modo de acção G (<i>sterol biosynthesis in membranes</i>).....	23
Figura 7- Curvas de distribuição de sensibilidade das espécies baseadas em valores de toxicidade aguda para o modo de acção non-EBDC (<i>multi-site contact activity whose chemical group are: dimethyl dithiocarbamate, phthalimide, chloronitrile, sulfamide, guanidine, triazine, quinone, anthraquinone or inorganic</i>).....	24
Figura 8- Curvas de distribuição de sensibilidade das espécies baseadas em valores de toxicidade aguda para o modo de acção D (<i>amino acids and protein synthesis</i>).....	25

Lista de Acrónimos e Siglas

BCF- Bioconcentration factor; Factor de bioconcentração

EC₁₀ – “Effective concentration 10%”; Concentração com efeito em 10% da população

EC₂₀ – “Effective concentration 20%”; Concentração com efeito em 20% da população

EC₅₀ – “Median effective concentration”; Concentração efetiva média

ELS – “Early life stage”; Fase inicial de vida

ERA – “Environmental risk assessment”; Avaliação de risco ambiental

EBDC – “Ethylene-(bis)-dthiocarbamates ”; Etilenobisditiocarbamatos (grupo de fungicidas)

FLC – “Full life cycle”; Ciclo de vida completo

HC₅ – “Hazard concentration 5%”; Concentração de perigo a 5%

HC₅₀ – “Median hazard concentration”; Concentração de perigo média

LC₅₀ – “Median lethal concentration”; Concentração letal média

LOEC- “Lowest observed effect concentration”- Concentração mais baixa que provoca efeitos

MOA – “Mode of action”; Modo de ação

NOEC – “No observed effect concentration”; Concentração sem efeitos observáveis

PAF – “Potentially Affected Faction”; Fração Potencialmente Afetada

PEC – “Predicted environmental concentration”; Concentração prevista no ambiente

RAC – “Regulatory acceptable concentration”; Concentração legislativa aceitável

SSD – “Species sensitivity distribution”; Distribuição da sensibilidade das espécies

TER – “Toxicity/exposure ratio”; Razão toxicidade/exposição

Trel – “Relative tolerance”; Tolerância relativa

UE- União Europeia

1. Introdução

Com o aumento da população mundial cresceu a procura de bens de consumo, o que provocou uma maior intensificação na utilização de pesticidas para reforçar a produtividade agrícola. Este crescente uso de pesticidas torna-se prejudicial quando, através de escorrências, lixiviações e outras formas de dispersão, os ecossistemas aquáticos acabam por ser expostos a níveis de concentração que podem provocar efeitos negativos nesses ecossistemas.

Apesar dos fungicidas serem utilizados na agricultura há décadas e de haver evidências destes pesticidas em águas de superfície, existem relativamente poucos dados disponíveis sobre os seus efeitos para os organismos não-visados no ambiente aquático, pois, apenas nos países do sul da Europa, os fungicidas são os pesticidas mais utilizados na agricultura. Devido ao facto do clima ser mais quente, a propagação dos fungos está assim mais facilitada nos países do sul. Este facto explica então a discrepância de valores relativamente à utilização de fungicidas por países do sul e do norte da Europa (Daam et al., 2009). No caso de Portugal são descritas no quadro seguinte as vendas registadas em 2011 dos produtos para protecção de plantas (Quadro 1).

Quadro 1 - Produtos para protecção de plantas vendidos em Portugal no ano de 2011.

(Fonte: DGAV, 2012)

Tipo	Quantidade vendida (kg de substância ativa)
Fungicidas	9968444
Herbicidas	1995271
Inseticidas/Acaricidas	334400
Reguladores de crescimentos de plantas	3868
Moluscicidas	10317
Outros	1690163
Total	14002463

Os dados existentes sobre os efeitos dos fungicidas nos organismos são obtidos, nomeadamente, através de testes de toxicidade feitos em laboratório onde aqueles são expostos a diferentes concentrações de pesticidas. A sua resposta é usada para detetar e avaliar efeitos adversos, letais ou subletais destes fungicidas nos organismos e ainda calcular valores de toxicidade.

Na avaliação ecotoxicológica deve ter-se em conta o desenvolvimento científico, assim como todos os dados biológicos e informações disponíveis importantes para a avaliação do perfil ecotoxicológico da substância ativa. Deve-se averiguar também os efeitos potencialmente negativos observados durante os estudos ecotoxicológicos de rotina, fazendo-se estudos adicionais para investigar as causas e avaliar o significado desses efeitos (SANCO, 2010).

Os testes com organismos aquáticos, podem variar no grau de complexidade desde bioensaios até estudos de campo mais complexos. Nos bioensaios apenas é usada uma espécie padrão (“single species tests”) para vários grupos taxonómicos. Contudo, as desvantagens deste método são a falta de realismo ecológico e o número limitado de espécies testadas.

Podem ainda considerar-se outros testes para avaliar a toxicidade dos pesticidas, como os ensaios com modelos de ecossistema (microcosmos e mesocosmos), que constituem uma “ponte” entre os bioensaios e os ensaios de campo. Estes testes, que permitem a replicação, são facilmente controláveis e fornecem realismo ecológico. Segundo Crossland et al. (1992), microcosmos são sistemas experimentais onde o volume de água não excede os 15 m³ ou canais experimentais onde o comprimento é inferior a 15 m. Por outro lado, mesocosmos são sistemas experimentais com mais de 15 m³ de água ou canais experimentais com mais de 15 m de comprimento. As desvantagens destes modelos de ecossistemas são o facto de serem bastante dispendiosos, e de quanto maior for o nível de complexidade, mais difícil se torna estabelecer relações de causa-efeito (Daam e Van den Brink, 2011)

Na Europa, o processo de avaliação do risco para fungicidas utiliza informações de estudos de ecotoxicidade que variam em complexidade, desde bioensaios de laboratório (*single species tests*) até estudos de campo. Dever-se-á, contudo, extrapolar, com cuidado, os dados obtidos através de algumas espécies para todas as que possam ser expostas a um fungicida, pois estes podem ter um largo espectro de atividade (Maltby et al., 2009). De modo a reduzir esta incerteza, pode-se recorrer a curvas de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD), que incorporam mais valores de toxicidade do que apenas os valores relativos às espécies padrão (Maltby et al., 2009). Estudos anteriores com inseticidas e herbicidas demonstraram que as curvas SSD com base nos grupos taxonómicos mais sensíveis podem ser usadas para determinar as concentrações limiaries (hazard concentration HCx), que agem como protetores das comunidades.

Por um lado, é claramente aceite que os inseticidas e herbicidas atuam mais directamente nos crustáceos e produtores primários, grupos taxonómicos mais sensíveis a

este tipo de pesticidas. Por outro lado, não está claro qual dos três grupos taxonómicos, utilizados em avaliações de risco de pesticidas (vertebrados (peixes), invertebrados ou os produtores primários), deve ser o foco de atenção para os estudos com fungicidas (Maltby et al., 2009).

Tendo isso em atenção, este trabalho organizou-se em quatro capítulos, a saber: o primeiro constitui o intróito; o segundo, no qual se faz uma descrição da avaliação de risco prospectiva dos pesticidas em ambiente aquático; no terceiro, apresentam-se os materiais e métodos, os resultados e a sua discussão, segundo a forma de artigo científico, mas integrando esta tese como um capítulo e, por último, no capítulo quatro, são expostas as conclusões deste estudo.

2 Avaliação Prospectiva de Risco Ambiental em Ecossistemas Aquáticos

Por forma a proteger as espécies de água doce de efeitos que podem ser provocados pela contaminação do seu ecossistema, muitos países começaram a estabelecer critérios de qualidade das águas e a exigir uma avaliação de risco ambiental, designada doravante por ERA, antes do registo do pesticida. Na Europa, os testes possíveis para avaliar os riscos ambientais de pesticidas antes da sua colocação no mercado são descritos no documento de orientação da UE sobre Ecotoxicologia Aquática (SANCO, 2002) e no Regulamento n.º 544/2011 (EC, 2011), SANCO 2010 (SANCO, 2010) um documento de apoio ao Regulamento n.º 1107/2009 (EC, 2009) e, mais recentemente, no Regulamento n.º 283/2013 (EC, 2013). Por outro lado, a Diretiva Quadro da Água 2000/60/CE (EC, 2000) pretende que se atinja um "bom estado" das águas europeias, o que será alcançado, em parte, se se protegerem as populações de organismos aquáticos desta pressão (Daam e Van den Brink, 2011).

A directiva suprarreferida exige uma avaliação retrospectiva (de diagnóstico), na qual é necessário considerar os efeitos conhecidos, e o risco existente ou passado, assim como as descargas para o ambiente. Além da abordagem retrospectiva, é também feita uma avaliação prospetiva (de prognóstico) antes da comercialização ou utilização do pesticida, que faz uso de modelos para estimar a exposição (Solomon et al., 2008). Para tornar a avaliação de risco ambiental mais fácil do ponto de vista da avaliação prospetiva é frequente recorrer-se a uma abordagem por níveis. A base fundamental desta abordagem é a progressão, pois inicia-se com uma avaliação simples para depois se avançar para testes mais específicos, tornando-se assim, a avaliação mais complexa e reduzindo a incerteza desta avaliação.

Esta avaliação por níveis permite focar mais atenção nas substâncias mais problemáticas uma vez que as substâncias que não apresentam risco são aceitas logo após a avaliação preliminar, isto é, em níveis iniciais.

O nível um da ERA é baseada em valores do quociente entre a toxicidade (PNEC: concentração sem efeitos previsíveis) e a exposição (PEC: concentração ambientalmente prevista). A PNEC é baseada em valores de testes de bioensaios feitos em laboratório com um número limitado de espécies padrão. Os valores de PEC são obtidos através de modelos computacionais, nos quais se tem em conta as características dos pesticidas, a dose recomendada e um cenário padrão simulado. Como os valores limite são uma estimativa do quociente entre a toxicidade e a exposição (TER), aplica-se um fator de incerteza para garantir a proteção de espécies não testadas e que eventualmente possam ser mais sensíveis. Consequentemente, níveis superiores desta avaliação podem incluir dados resultantes de teste de toxicidade de laboratório com espécies adicionais (permitindo assim a construção de curvas SSD), testes aquáticos de microcosmos e mesocosmos (modelos de ecossistema), modelos populacionais e "Food-web". Como um todo, o sistema de níveis precisa:

1. Ser adequadamente protetor
2. Ser internamente consistente
3. Ter relação custo-eficácia
4. Resolver problemas com maior grau de realismo e complexidade quando se avança de níveis mais baixos para níveis mais elevados (Brock e Van Wijngaarden, 2012).

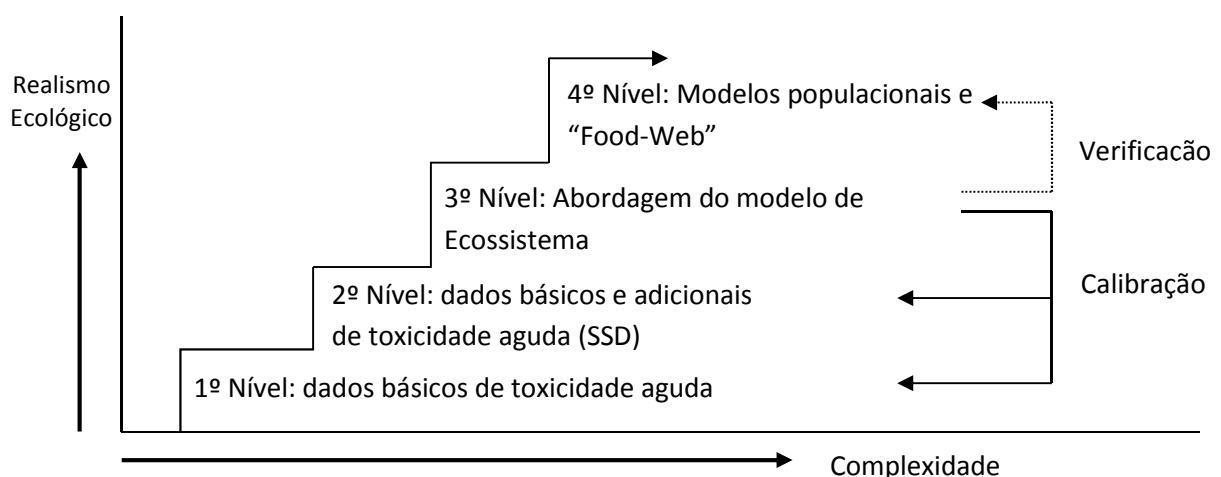


Figura 1 - Esquema da abordagem por níveis para a avaliação do efeito dos pesticidas (Adaptado de Brock e Van Wijngaarden, 2012)

2.1 Procedimentos de Avaliação de Risco Ambiental em Ecossistemas Aquáticos

Na busca de uma uniformidade de critérios, o processo de avaliação de risco de pesticidas para ecossistemas aquáticos está descrito no Documento de Orientação da EU sobre Ecotoxicologia Aquática (SANCO, 2002). Posteriormente, estes documentos foram revistos e actualizados (SANCO, 2010; EC, 2013; EFSA, 2013) tendo em conta novas exigências para os testes de toxicidade aguda e crónica para os organismos aquáticos necessários à avaliação de risco.

Abaixo, expõem-se os procedimentos de avaliação utilizados:

SANCO 2002

Vertebrados (Peixes)

✓ **Toxicidade Aguda:**

No caso da toxicidade aguda para os peixes são sempre exigidos os dados para o *Oncorhynchus mykiss* e uma espécie de água quente.

✓ **Toxicidade Crónica:**

O estudo de toxicidade crónica deve ser realizado excepto se se comprovar que a exposição prolongada, ou repetida, é improvável de ocorrer. Estes testes são importantes pois são a única medida para avaliar os efeitos subletais. O teste de toxicidade crónica deve ser exigido quando o DT₅₀ da fração água-sedimento (tempo de degradação médio no sistema água-sedimento) é ≥ 2 dias a um pH entre 6-9. Na prática, significa que os dados dos testes de toxicidade crónica são quase sempre necessários. Estes dados podem ser obtidos por três testes diferentes:

- Testes de acordo com os protocolos da OCDE 204 e 215 (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico; OCDE 1984, 2000),
- Teste ELS (teste de fase inicial de vida)
- Teste FLC (teste de ciclo de vida completo)

Sobre o teste OCDE 204, há algumas reservas, pois, o único *endpoint* considerado é a mortalidade e a duração de exposição é de apenas 14 dias. Além disso, o estágio de desenvolvimento do *O. mykiss* considerado não é particularmente sensível. No entanto, estudos conduzidos nos últimos anos de acordo com este protocolo consideram exposições de 21 dias e *endpoint* como crescimento, mortalidade e comportamento.

Acresce a estes factores, o estágio de desenvolvimento do *O. mykiss* a ser testado, ser o recomendado no protocolo da OCDE 215 para o “teste de crescimento juvenil”. Logo, o mais apropriado é a combinação dos dois protocolos. Assim, o estudo deverá então ter a duração de exposição de 28 dias e ter como *endpoint*, a sobrevivência, crescimento e comportamento. Para algumas substâncias, poderá ser necessário considerar um teste de ELS ou um FLC. Este último, só pode ser exigido se aquelas obedecerem a três requisitos (valor limite $<0,1 \text{ mg/l}$, $\text{BCF} > 1000$ e $\text{DT}_{90} > 100$ dias). Caso contrário, o teste a realizar será o ELS.

Produtores Primários (Algas e Macrófitas)

✓ Toxicidade Crónica:

É necessário para todos os tipos de pesticidas um teste com algas verdes. Deverá ser realizado um teste adicional com uma segunda espécie de algas para os herbicidas e reguladores de crescimento de plantas, dado terem maior potencial de alta toxicidade para os produtores primários. Esta segunda espécie deverá ser de outro grupo diferente do da primeira, como por exemplo as diatomáceas ou as cianobactérias.

Os testes com macrófitas deverão ser realizados para herbicidas e reguladores de crescimento de plantas, recorrendo a *Lemna sp.* o *endpoint* mais importante é o número de frondes, mas se existirem valores de toxicidade para a biomassa ou outro parâmetro que sejam mais baixos, então estes poderão ser usados na avaliação de risco.

Invertebrados

A *Daphnia* é utilizada como espécie representativa dos invertebrados por vários motivos, entre os quais se destacam a sua facilidade de cultura, a disponibilidade de protocolos internacionais tanto para testar a toxicidade aguda como para a crónica, bem como a sua sensibilidade a substâncias tóxicas.

✓ Toxicidade Aguda:

São sempre necessários os dados de toxicidade aguda para a *Daphnia*. Para os herbicidas e fungicidas esses dados são considerados representativos para os insetos aquáticos. Porém, se se tratar de um inseticida, tem se acautelar se este tem um modo de ação específico. Nesse caso, a sensibilidade dos invertebrados poderá não estar bem representada pela *Daphnia*, e deverá então ser feito um teste de toxicidade aguda com o *Chironomus riparius* (48 h somente em água).

✓ **Toxicidade Crónica:**

São necessários dados de toxicidade crónica para compostos que são aplicados mais do que uma vez por período de cultura, ou sempre que se verificar que $DT_{50} \geq 2$ dias. Se o inseticida apresentar um modo de ação específico e se EC_{50} 48 h para *Chironomus sp* for pelo menos dez vezes inferior aos valores de EC_{50} 48 h da *Daphnia*, então, deverá ser feito um estudo de toxicidade crónica com *Chironomus sp*.

SANCO 2010, EC (2013), EFSA (2013)

Vertebrados (Peixes)

✓ **Toxicidade Aguda:**

No caso da toxicidade aguda para os peixes são exigidos os dados para o *O. mykiss* devendo o teste ser conduzido a 100 mg substância/L ou numa concentração adequada do pesticida. Quando a mortalidade é detetada no teste dos peixes, será necessário um estudo de dose-resposta, para determinar LC_{50} utilizada na avaliação de risco.

✓ **Toxicidade Crónica:**

Um teste de toxicidade crónica é necessário sempre que a exposição em águas superficiais é provável e a substância for considerada estável em água, ou seja, se houver uma perda inferior a 90% da substância original ao longo de 24 horas via hidrólise.

Neste relatório há dois possíveis testes:

- Teste ELS (teste de fase inicial de vida)
- Teste FLC (teste de ciclo de vida completo)

Quando se usa o teste ELS, este deve determinar os efeitos sobre crescimento, desenvolvimento, comportamento e os efeitos observados em estágios iniciais de vida dos peixes. Assim a EC_{10} e EC_{20} devem ser referidas, bem como o NOEC.

Caso seja feito o teste FLC, este deverá determinar efeitos sobre a reprodução e a viabilidade da geração descendente, devendo também apresentar os valores de EC_{10} e EC_{20} , bem como o NOEC.

Produtores Primários (Algas e Macrófitas)

✓ Toxicidade Crónica:

- Efeito sobre o crescimento das algas

O teste é sempre necessário para algas verdes e este deve referir os valores de EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} e os correspondentes valores de NOEC para a taxa de crescimento (das algas) com base em medições de biomassa. Para substâncias que apresentam atividade herbicida deverá ser realizado um teste numa segunda espécie de um grupo taxonómico diferente como, por exemplo, *Navicula pelliculosa*. O teste deve igualmente ser conduzido até concentrações de 100 mg substância/L

-Efeito sobre macrófitas aquáticas (caso seja regulador de crescimento ou herbicida)

Os testes para determinar os efeitos tóxicos sobre as macrófitas devem ter em atenção os valores de EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} e os correspondentes valores NOEC. Para as macrófitas a espécie mais utilizada é a *Lemna sp*, pelo que é necessária a sua taxa de crescimento e rendimento, com base nas medições do número de folhas e pelo menos uma variável de medição adicional (peso seco, peso húmido ou área dos frondes).

São, no entanto, necessários testes adicionais com outras espécies de macrófitas pois a *Lemna sp*. não é suficientemente representativa devido a diferenças nos modos de ação específicos. Por isso, serão necessários testes adicionais com outras espécies consoante o modo de acção ou se houver evidências claras de:

- Maior toxicidade para dicotiledóneas, utilizando-se habitualmente a *Myriophyllum aquaticum*;
- Maior toxicidade para as monocotiledóneas, utilizando-se a *Glyceria maxima*.

Invertebrados

✓ Toxicidade Aguda:

Para a avaliação da toxicidade aguda dos invertebrados é necessária a realização de dois testes:

1) EC_{50} 48h para *Daphnia*

2) EC_{50} 48h para *A. bahia* e/ou *C. riparius* (caso seja um inseticida).

O teste deve determinar a toxicidade aguda para as 24 e 48 horas da substância teste, expressa em EC₅₀ para a imobilização e, sempre que possível, a maior concentração que não provoca a imobilização.

✓ **Toxicidade Crónica:**

Para determinar a toxicidade crónica, são necessários dados de todas as substâncias nomeadamente: onde a exposição em águas superficiais seja provável e onde a substância seja considerada estável em água, ou seja, onde haja uma perda inferior a 90% da substância original ao longo de 24 horas via hidrólise.

Caso a substância seja um regulador de crescimento de insetos, é necessário realizar um teste adicional com *C. riparius*. Quanto à reprodução e desenvolvimento da *Daphnia magna* e de outros invertebrados aquáticos, o teste deverá medir os efeitos adversos, tais como imobilização e reprodução. Os valores de EC₁₀ e EC₂₀ devem ser avaliados, bem como o valor de NOEC.

2.2 Espécies a utilizar como espécies representativas dos grupos taxonómicos na avaliação de risco ambiental em ecossistemas aquáticos

As macrófitas aquáticas desempenham vários papéis críticos e funcionais nos ecossistemas aquáticos. Os primeiros sequestram carbono, produzem oxigénio, estabilizam os sedimentos e contribuem para a dissipação de contaminação e da degradação. Ao realizar essas funções, as macrófitas fornecem serviços ambientais importantes ao ecossistema. Consequentemente, são um dos grupos funcionais de organismos a serem abordados na avaliação de riscos dos pesticidas (Giddings et al., 2012). No grupo das macrófitas aquáticas, a representatividade da *Lemna* spp. foi posta em causa durante o desenvolvimento dos novos requisitos de dados para o registo de pesticidas na UE. Esta questão foi discutida no seminário, "Avaliação de Risco para Pesticidas em Macrófitas Aquáticas (AMRAP)" (Maltby et al., 2009). Uma das recomendações deste seminário foi para que se reunisse e analisassem dados sobre toxicidade de macrófitas, a fim de permitir uma avaliação da sensibilidade da *Lemna* spp. em relação a outras espécies de macrófitas. Concluiu-se que as curvas SSD, que integram os resultados de testes de toxicidade em laboratório com várias espécies para estimar concentrações perigosas (valores HCx), foram considerados ferramentas úteis para resolver a questão da sensibilidade relativa (Maltby et al., 2009).

Num estudo recentemente realizado por Giddings et al., (2012), discute-se precisamente a utilização da *Lemna* spp. como espécie padrão das macrófitas. Utiliza-se, por isso, a abordagem das curvas SSD para explorar a sensibilidade relativa da *Lemna* spp. (especialmente *L. gibba*) relativamente a outras espécies de macrófitas. Como a *Myriophyllum* spp. tem sido sugerida para nova espécie padrão de teste para macrófitas para resolver problemas concretos, como a questão dos modos de ação específicos afetarem as dicotiledóneas e a toxicidade de sedimentos, a sensibilidade do *Myriophyllum* spp. (especialmente *M. spicatum*) em relação a outras espécies de macrófitas, esta foi abordada na análise dos dados, também. Além disso, as quatro espécies de algas (teste *P. subcapitata*, *Anabaena flos-aquae*, *Navicula pelliculosa* e *Skeletonema costatum*), necessárias para o registo de pesticidas nos EUA, foram consideradas conjuntamente para avaliar o grau de proteção das espécies padrão de macrófitas e de algas juntos (Giddings et al., 2012).

No artigo acima mencionado, estavam disponíveis valores de EC₅₀ para seis ou mais espécies de macrófitas para cada um dos onze herbicidas e três fungicidas. Os modos de ação destas substâncias incluíam inibição da fotossíntese, a inibição de várias vias de biossíntese, inibição da respiração fúngica e outras vias de inibição. Após compilar os dados, executaram-se as curvas SSD, uma para cada pesticida. As conclusões deste artigo mostram que:

- a) A *Lemna gibba* e *M. spicatum* não são as espécies mais sensíveis para todos os herbicidas e fungicidas;
- b) *L. gibba* estava entre as espécies de macrófitas mais sensíveis para cerca de metade dos herbicidas e fungicidas examinados, mas revelou-se bastante insensível para cerca de um quarto dos produtos químicos. *L. gibba* foi a espécie *Lemna* mais sensível para quase todos os produtos químicos.
- c) *M. spicatum* estava entre as espécies de macrófitas mais sensíveis para aproximadamente um quarto dos herbicidas e fungicidas examinados. *M. spicatum* estava entre as macrófitas menos sensíveis a vários outros produtos químicos. *M. spicatum* foi a espécie *Myriophyllum* mais sensível para a maioria dos produtos químicos, nos quais as comparações eram possíveis.

O uso de curvas SSD tem sido amplamente discutido na área de ecotoxicologia e tem sido recomendada para avaliação da regulação dos pesticidas. Na análise aqui relatada, as curvas SSD foram utilizadas para resolver o problema da sensibilidade relativa de espécies de macrófitas e de algas em relação a outras espécies. Em conjunto, os resultados, acima descritos para os catorze produtos químicos, mostram que nem *L. gibba*,

nem *M. spicatum* foram consistentemente as espécies de macrófitas mais sensíveis para todos os herbicidas e fungicidas examinados. Estes resultados estão de acordo com outros investigadores (Arts et al., 2008; Fairchild et al., 1997,1998; Vervliet-Scheebaum et al., 2006) que concluíram que nenhuma espécie de macrófitas foi sempre a mais sensível, e que um conjunto de testes a várias espécies de plantas aquáticas pode ser necessário para realizar as avaliações de risco para herbicidas (Giddings et al., 2012).

No artigo Brock e Van Wijngaarden (2012) foi estudado qual a espécie (*Americamysis Bahía* e/ou *Chironomus* spp) que deve integrar a avaliação de primeiro nível para inseticidas, de acordo com o novo requisito proposto pela UE além da *D. magna*. Para isso, foram utilizadas concentrações limite obtidas em estudos de microcosmos e mesocosmos com inseticidas, de modo a calibrar o primeiro nível do processo de avaliação de efeitos dos inseticidas. Agruparam os 31 inseticidas segundo 7 categorias: organofosforados, carbamatos, piretróides, reguladores de crescimento de insetos, neonicotinóides, biopesticidas e outros tipos de inseticidas. Os dados de toxicidade de espécies únicas (single species) foram selecionados segundo a sua duração (48-96h) e os *endpoint* (imobilização e mortalidade). Cada estudo foi classificado como regime de exposição única ou regime de exposição repetida. Para cada composto e regime de exposição obteve-se o NOEC_{eco} (concentração sem efeitos observáveis no ecossistema) a partir de ensaios com modelos de ecossistemas através de testes de concentrações sem efeitos ambientais significativos (classe de efeito 1) ou efeitos leves em amostras individuais (classe de efeito 2) para o *endpoint* mais sensível (Brock e Van Wijngaarden, 2012). Em seguida, compararam os NOEC_{eco} com as RAC (concentrações legislativas aceitáveis= valor de toxicidade aguda a dividir por um fator de incerteza de 100 (E(L)C₅₀/100)) na proporção de 1:1 para crustáceos de primeiro nível, com base nos dados de toxicidade aguda para a *D. magna*, *A. bahia*, *Chironomus* spp. e *G. pulex*, obtidos em ensaios de *single species*.

Concluiu-se então que a proteção depende do modo de ação do inseticida avaliado. No caso dos organofosforatos, carbamatos e piretroides usando os dados de toxicidade aguda da *D. magna* ou estes em combinação com *C. riparius* (28d NOEC/EC₁₀), a maioria está protegida. No entanto, para neonicotinóides e reguladores de crescimento de insetos o mesmo não acontece, pois não há proteção completa, especialmente quando apenas se usa dados da *D. magna*.

Concluiu-se, ainda, que a avaliação de primeiro nível com base nos valores da *D. magna* em combinação com os valores de *A. bahia* e /ou *Chironomus* spp. é geralmente protetora para os efeitos ecológicos. Contudo, a avaliação apenas baseada na *D. magna* não é protetora para os efeitos ecológicos.

Como foi descrito por estudos anteriores, para cada pesticida há uma espécie padrão que é utilizada para bioensaios de laboratório. No caso dos herbicidas é a *Lemna spp.* e uma alga, no caso de inseticidas é a *D. magna*. No entanto, os valores de toxicidade de apenas uma espécie não são representativos de um grupo taxonómico. A propósito dos herbicidas, sabe-se que o grupo taxonómico mais sensível é o grupo dos produtores primários (algas e macrófitas) e nos inseticidas o grupo mais sensível é o dos invertebrados. Assim, a questão coloca-se quando se fala dos fungicidas, pois não há nenhum grupo que seja claramente mais sensível, e se assim for a avaliação terá que ser feita caso a caso (Maltby et al., 2009). Como se verifica, nenhum grupo taxonómico é o mais sensível para os fungicidas em geral. Surgiu então a possibilidade da sensibilidade das espécies estar relacionada com o modo de ação dos fungicidas ou como o regime de exposição. Maltby et al., (2009) testaram essa hipótese por meio de curvas SSD, recorrendo a dados de toxicidade aguda de 42 fungicidas e dados de modelos de ecossistemas de 12 fungicidas, que se dividiam por 7 modos de ação diferentes (Síntese de aminoácidos, divisão celular, produção de energia, integridade da membrana, nefrotóxico, biossíntese de esteróis e multisite, sendo que os multisite se dividem em EBDC e non-EBDC).

As conclusões a que se chegou neste estudo foram:

Dos 42 fungicidas estudados, 17 apresentaram atividade multisite e cinco deles eram fungicidas EBDC (ethylene bisdithiocarbamates). Comparando valores de EC_{50} , os peixes eram menos sensíveis que os invertebrados aos fungicidas EBDC, e menos sensíveis do que os invertebrados ou produtores primários para inibidores da biossíntese de esteróis.

Usando dados de toxicidade de vertebrados e invertebrados para 14 fungicidas foram construídas curvas SSD separadas, esta análise confirmou a menor sensibilidade dos peixes para fungicidas EBDC (valores de HC_5 dos invertebrados sendo significativamente inferiores aos valores HC_5 vertebrados), mas não detetou diferenças significativas nas estimativas de HC_5 entre grupos taxonómicos dentro dos outros modos de ação.

No presente trabalho, os objetivos serão fazer um estudo de quais as espécies ou os grupos taxonómicos mais sensíveis para os fungicidas, verificar a sensibilidade relativa dos grupos taxonómicos para os diferentes modos de ação dos fungicidas e identificar quais as espécies mais apropriadas para utilizar como padrão nos fungicidas.

3. Risk Assessment of Fungicides to Aquatic Organisms- Representativeness of Standard Species Sensitivity for Other Non-Target Aquatic Species

Bernardino, J., Cerejeira, M.J., Daam, M.A.*

Instituto Superior de Agronomia, University of Lisbon, Tapada da Ajuda,
1349-017 Lisboa, Portugal

* Corresponding author: mdaam@isa.utl.pt

3.1 Abstract

Studies done with insecticides and herbicides show that SSD (Species Sensitivity Distribution) curves based on more sensitive taxonomic groups can be used to determine the environmental quality limits for species protection. The main objective of this study was to verify the relative sensitivities of taxonomic groups towards fungicides' with different modes of action (MOA), and which species are the most appropriate to use as standard test species for fungicides in the context of environmental risk assessment of fungicides to aquatic ecosystems. Data could be collected for 86 different fungicides, for which Trel (relative tolerance) values were calculated. Data was divided according to the taxonomic groups: crustaceans, fish, primary producers and invertebrates, and the SSD curves were constructed using the calculated Trel values. Simultaneously with this taxonomic group division, the data of the 86 fungicides were also grouped by MOA, thus obtaining the information of which the most sensitive species for each mode of action for fungicides.

It concluded that for most of MOAs, the most sensitive taxonomic group is the primary producers. It was hence concluded that the MOA of fungicides has an influence on the identification of the most sensitive taxonomic group.

Key words: Environmental Risk Assessment, Species Sensitivity Distribution, Fungicides, Modes of Action

3.2 Introduction

As the world population increases, a greater demand for agricultural products follows, which has triggered a greater usage of pesticides, in order to maximize the agricultural yield. In order to protect ecosystems from the pollution caused by this, many countries have now started to impose guidelines for water quality and are demanding an environmental risk assessment (ERA) prior to pesticide registration (Daam et Van den Brink, 2011).

In Europe, the possible tests to assess the environmental risks of pesticides prior to their placing on the market are described in the guidance document of the EU on Aquatic Ecotoxicology (SANCO, 2002) and Regulation No 544/2011 (EC, 2011), SANCO 2010 (SANCO, 2010) a document in support of Commission Regulation No 1107/2009 (EC, 2009) and, more recently, in Regulation No 283/2013 (EC, 2013). Moreover, the Framework Directive 2000/60/EC (EC 2000) aims to achieve an "good condition" of European waters, which will be achieved, in part, is to protect the populations of aquatic organisms in this pressure.

In such assessments, tiered approaches are frequently used, where at a first level or tier, a preliminary assessment is carried out, and the pesticides that fail to yield any risks are thereby deemed acceptable. Only the pesticides that do yield a risk factor are carried to the next levels.

The ERA Level 1 is based on the quotient of toxicity (PNEC: predicted no-effect concentration) and exposure (PEC: environmentally expected concentrations) where the PNEC is based on values of tests made in the laboratory bioassays with a limited number of species standard, and the PEC values are obtained by computational models where one takes into account the characteristics of pesticides, the recommended dose and simulated default scenario.

Since at level 1, only data from bioassays, from a limited number of standard species is used, an uncertainty factor is applied in order to ensure the protection of more vulnerable untested species.

At higher levels of this assessment, data resulting from in-lab toxicity tests on additional species may be used, adding greater complexity to it thus allowing the construction of SSD curves.

The regulatory risk assessment process for fungicides in Europe uses information from ecotoxicity studies ranging in complexity, from standardized single-species toxicity tests

to (semi-)field studies. Extrapolating data obtained for a few species to all species that may be exposed to a chemical is highly uncertain and it is particularly problematic for fungicides that may have a broad spectrum activity. One approach for reducing this uncertainty is to characterize interspecific variation in toxicant sensitivity by constructing species sensitivity distribution curves (SSD) (Maltby et al., 2009).

SSD curves are usually based on a lognormal regression distribution, where data from standard species as well as non-standard other species is used. The key advantage provided by the use of these curves is the reduction in uncertainty, as the greater number of tested species provides a more representative sample of the species that may exist in ecosystems.

SSD curves may be used both in prospective and retrospectively risk assessment. Prospectively, we obtain a concentration values that protect x% of species (usually 95%) through the HC_x value (HC_x - Hazard Concentration x%, e.g. HC_5 to protect 95% of the taxa) calculated from the lognormal recession curve, and retrospectively it allows us to predict potentially affected fraction (PAF) of the species assemblage at a given pesticide concentration.

Previous studies done with insecticides and herbicides show us that SSD curves based on more sensitive taxonomic groups can be used to determine the concentration values that protect the communities (e.g. Maltby et al. 2005; Van den Brink et al. 2006).

Considering their type of action, it is clear that the taxonomic groups most sensitive to insecticides and herbicides are usually crustaceans and primary producers respectively. The same does not apply to fungicides, where it is not clear which of the taxonomic groups used in environmental risk assessments on pesticides (vertebrates (fish), invertebrates or primary producers) should be the focus of attention (Maltby et al. 2009).

The main objectives of this study were: a) To verify the relative sensitivities of the taxonomic groups to the different mode of actions of fungicides, and b) assess which species are the more appropriate to use as standard test species in the ERA for fungicides. In this work will be used bioassays data instead ecosystem models, like in Brock and Wijngaarden (2012).

3.3 Materials and Methods

In order to create an Excel document containing the data from the fungicides under investigation, the List of Fungicides Common Names 2012 was consulted and information on fungicide common name, modes of action, FRAC codes and chemical groups inserted in the database.

To expand the number of fungicides, the Alan Woods Compendium of Pesticides Common Names (Alan Wood Database, 2010) was also consulted, and the information mentioned above was added to the database for those fungicides for which such information was not available in the FRAC List 2012 (*Fungicide Resistance Action Committee*) (FRAC, 2012). In this way, information could be obtained for a total of 410 fungicides.

Subsequently, the EFSA website was consulted, and data from the DAR (*Draft Assessment Reports*) were inserted in an Excel document for each 410 fungicides, if available. In this way, data for 181 on CAS number, scientific name, common name of the species, group that the species belongs to, exposure types (injected, subcutaneous, etc), chemical analysis method (calculated, measured, non-measured) support type (fresh water, salty water), trial location (field, laboratory), trial duration and respective unities; *endpoint* (EC₅₀, LC₅₀, NOEC or LOEC) and respective values; effect/measurement and respective values could be obtained.

The data for the 181 available fungicides was then uniformed, injection based tests were rejected, given that it is a type of exposure that is not relevant for this investigation, as we would only conduct exposures through water; all the units in which the values were expressed were reviewed and the tests made in the laboratory were separated from those done in field. Also, all tests that did not comply with the selection criteria of table 2 (used to reduce *endpoint* and test duration variability) were rejected.

Table 2 – Selection criteria used on acute and chronic toxicity tests (adapted from Van den Brink et al., 2006)

	<i>Endpoint</i>	Test duration (days)
<u>Acute Toxicity</u>	L(E)C ₅₀ mortality, immobility (animals), growth (plants)	fish 2-21, invertebrates 1-7, macrophytes 2-28, algae 1-7
<u>Chronic Toxicity</u>	NOEC or EC ₅₋₁₀ : growth, feeding, reproduction, mortality or immobility.	fish > 20, invertebrates ≥6, macrophytes ≥6, algae ≥2

After the standardization, the geometric mean was taken when more than one toxicity value was available for a given species (and endpoint).

For the same species, the geometric mean was taken for each group of measured effects (eg L(E)C50 values for immobility and mortality available for an invertebrate). If there is more than one group of measured effects for the same species, the lowest value of geometric mean was used as the final value gmEC50, thus, only a final value for each species is used.

3.3.1 Relative Tolerance Calculation

With the goal of making the toxicity values from the 181 fungicides comparable, the relative tolerance (T_{rel}) principle was used. The values from the geometric averages (gmEC50 or gmNOEC) for each species were divided by the geometric average of a single species, in this case, the single species used was *Daphnia magna*.

The formulas used for those calculations were:

$$T_{rel} = \frac{gmEC50_i}{gmEC50_{D.magna}} \quad T_{rel} = \frac{gmNOEC_i}{gmNOEC_{D.magna}}$$

gmEC50_i = EC50 geometric average for species i

gmEC50_{D. magna} = EC50 geometric average for *Daphnia magna*

gmNOEC_i = NOEC geometric average for species i

gmNOEC_{D. magna} = NOEC geometric average for *Daphnia magna*

The benchmark value is the one from *D. magna*, which is 1. If a species is more sensitive than *D. magna*, it will yield a Trel value lower than 1. If a species is less sensitive than *D. magna*, it will yield a Trel value greater than 1.

Due to the fact that it is necessary to have the values for *Daphnia magna* and for a second species in order to calculate the Trel value it was not possible to calculate Trel for all fungicides. In total, Trel values for 95 of the 181 fungicides for which data were initially encountered were rejected due to lack of data, so data from only 86 fungicides was used.

3.3.2 Construction of the SSD curves

From the data relative to the 86 investigated fungicides, the EC50 and NOEC information was grouped by the fungicide's mode of action and scientific name of the species.

Whenever two species were the same, the geometric mean was used in Trel (relative tolerance) to give the gmTrel. After this, the gmTrel values were ordered from the lowest to the highest within each group, and assigned to the sequential each then calculated the rank.

$$\text{Rank} = \frac{\text{Number} - 0,5}{n^{\circ} \text{species}}$$

To construct the SSD curves, the ETX (version 2.0) software was used (Van Vlaardingen et al, 2004). The gmTrel geometric average values for each species were introduced and the software calculated the HC₅ (risk concentration for 5% of species) and HC₅₀ (risk concentration for 50% of species) risk concentrations, using a log-normal distribution.

The software also tests the quality of the distribution adjustment via the Anderson-Darling tests, with a 5% significance level. Only the groups that passed the Anderson-Darling test and had more than 5 and less than 250 available values had their graphs plotted.

Simultaneously the data grouped by another method, created by 11 classes each representing a mode of action of fungicides, and used the same program as the previous methodology (ETX 2.0), but one class have too much values so NR(not recorded) class was not used (Table 3). In the end only 43 fungicides were available to be used.

Table 3- Fungicides used in this study organized by mode of action and based on acute toxicity data

MOA	Compound	No. taxa
A	Hymexazole	2
	Metalaxyl	14
	Octhilinone	6
B	Benomyl	18
	Carbendazim	1
	Thiabendazole	1
	Thiophanate-methyl	7
C	Azoxystrobin	7
	Carboxin	7
	Dinocap	9
	Fluazinam	6
	Kresoxim-methyl	1
D	Cyprodinil	8
	Oxytetracycline	11
E	Iprodione	11
	Vinclozolin	5
F	Biphenyl	5
	Dicloran	2
	Etridiazole	7
	Iodocarb	4
	Quintozene (PCBN)	1
G	Bromuconazole	8
	Cyproconazole	3
	Fenarimol	1
	Propiconazole	16
	Tebuconazole	1
	Triadimefon	1
	Triadimenol	2
	Triforine	1
Non-EBDC	Anilazine	9
	Captafol	9
	Captan	21
	Chlorothalonil	37
	Ferbam	1
	Folpet	4
	Thiram	13
	Ziram	2
EBDC	Mancozeb	17
	Maneb	8
	Metiram	1
	Zineb	2
Unknown	Cymoxanil	10
	Dodine	13

Inside the file grouped according to the mode of action is still divided the species into several groups are: crustaceans (including insects and crustaceans), invertebrates (including invertebrates, molluscs and worms), fish and algae / macrophytes.

When the data were grouped by mode of action results in a graph, with the most and least sensitive species for each mode of action, on the other hand if the data are grouped according to the scientific name, then we have a graph where there is a curve for each group taxonomic.

For the construction of the SSD curves the X axis represents the concentration values and the Y axis represents the normal distribution values. To represent a point for each of the species, the X axis represents the gmTrel values and the Y axis represents the rank values.

3.4 Results and Discussion

After organizing the data from the 86 fungicides only by taxonomic groups (i.e., without considering modes of action), the Species Sensitivity Distribution (SSD) curves were obtained, using the values from the geometric average for the relative tolerance on the X-axis and the rank values on the Y-axis. For the tests of acute toxicity (EC50 values), none of the taxonomic groups was the most sensitive one, since data of primary producers cannot be considered because they did not passed the Anderson-Darling test (Figure 2).

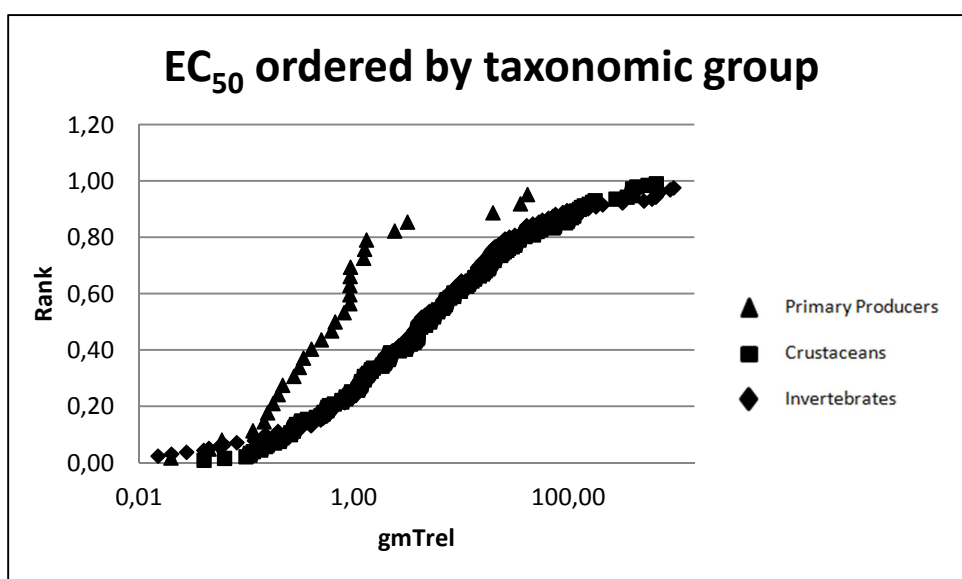


Figure 2 - Species sensitivity distribution curves (SSD) based on acute toxicity data.

However, for the chronic toxicity tests (NOEC values), the invertebrate group came out as the most sensitive, although this curve did not pass on the Anderson-Darling test.

Given that organizing the results this way did not provide a clear answer on which is the most sensitive group, another approach was taken by organizing the results not only by taxonomic group, but also by considering the mode of action of the fungicides.

From this, 10 categories resulted, one per mode of action (A- nucleic acids synthesis; B- mitosis and cells division; C- respiration; D- amino acids and protein synthesis; E- signal transduction; F- lipid synthesis and membrane integrity; G- sterol biosynthesis in membranes; non-EBDC- multi-site contact activity whose chemical group are: dimethyl dithiocarbamate, phthalimide, chloronitrile, sulfamide, guanidine, triazine, quinone, anthraquinone or inorganic; EBDC- multi-site contact activity whose compound are: mancozeb, maneb, metiram, nabam or zineb; Unknown- unknown mode of action) (FRAC, 2012).

After this division, the SSD curves for each category were obtained and they showed that the fungicides' different modes of action trigger different 'most sensitive' taxonomic groups.

For the fungicides with the mode of action A (nucleic acid synthesis), the crustaceans are the most sensitive taxonomic group (Figure 3).

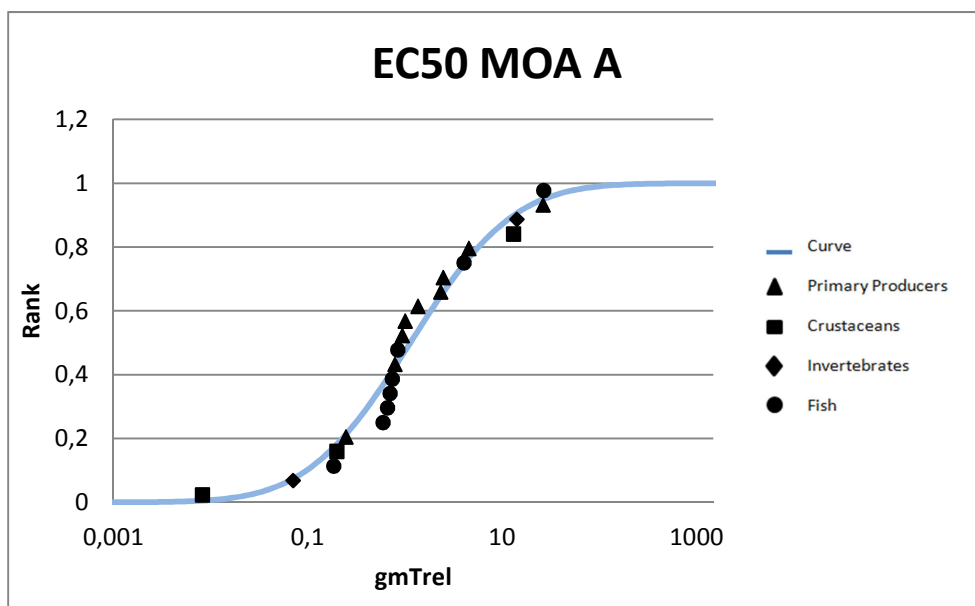


Figure 3- Species sensitivity distribution curves (SSD) based on acute toxicity data for mode of action A (nucleic acids synthesis).

However, the same does not happen for e.g. the fungicides with the mode of action F (lipid synthesis and membrane integrity), where primary producers are the most sensitive taxonomic group (Figure 4).

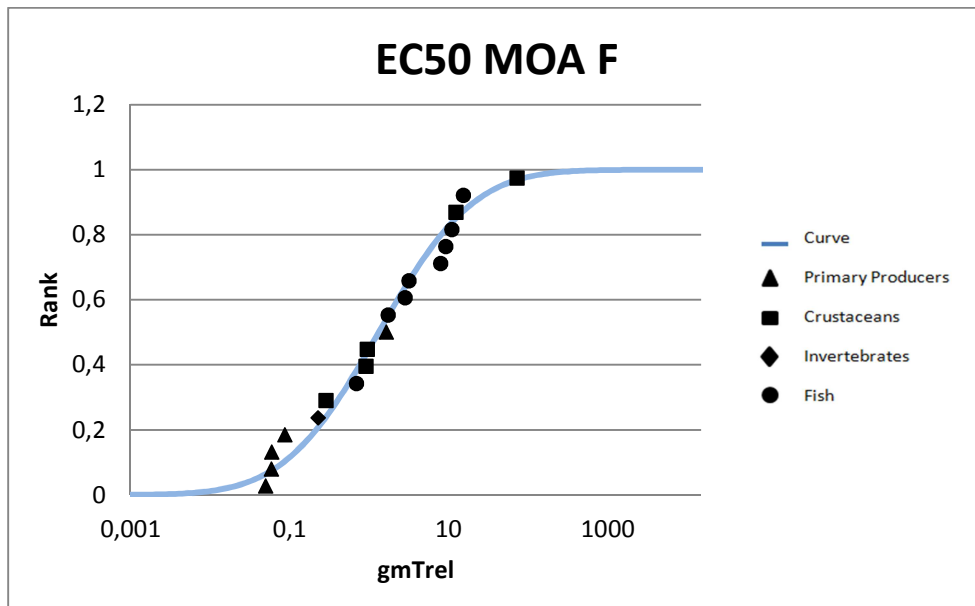


Figure 4 - Species sensitivity distribution curves (SSD) based on acute toxicity data for mode of action F (lipid synthesis and membrane integrity).

According to Maltby et al. (2009), the species sensitivity is likely to be related to the mode of action of fungicides, or to the exposure regime. Subsequently, Maltby et al. (2009) tested that hypothesis via SSD curves, using acute toxicity data from 42 fungicides and model ecosystem data for 12 fungicides divided in 7 different modes of action (amino acid synthesis, cell division, energy production, membrane integrity, nephrotoxic, sterol biosynthesis and multisite, the last being divided into EBDC and non-EBDC).

The conclusions reached in this study were that, comparing the EC_{50} values, fish were approximately 10 times more sensitive than invertebrates to non-EBDC fungicides with multisite activity but 10 times less sensitive than invertebrates to EBDC fungicides. Fish were also less sensitive than invertebrates and primary producers to fungicides that inhibit sterol biosynthesis. However, Separate SSDs curves were calculated using toxicity data from vertebrates or invertebrates for 14 fungicides. This analysis confirmed the lower sensitivity of fish towards EBDC fungicides (with the HC_5 values from the invertebrates being significantly inferior to those on vertebrates), but it did not detect significant differences on HC_5 taxonomic estimates within other modes of action.

In our study, the conclusions were partly the same as in the study mentioned above, as fish turned out to be the less sensitive taxonomic group towards fungicides with multisite EBDC mode of action (Figure 5).

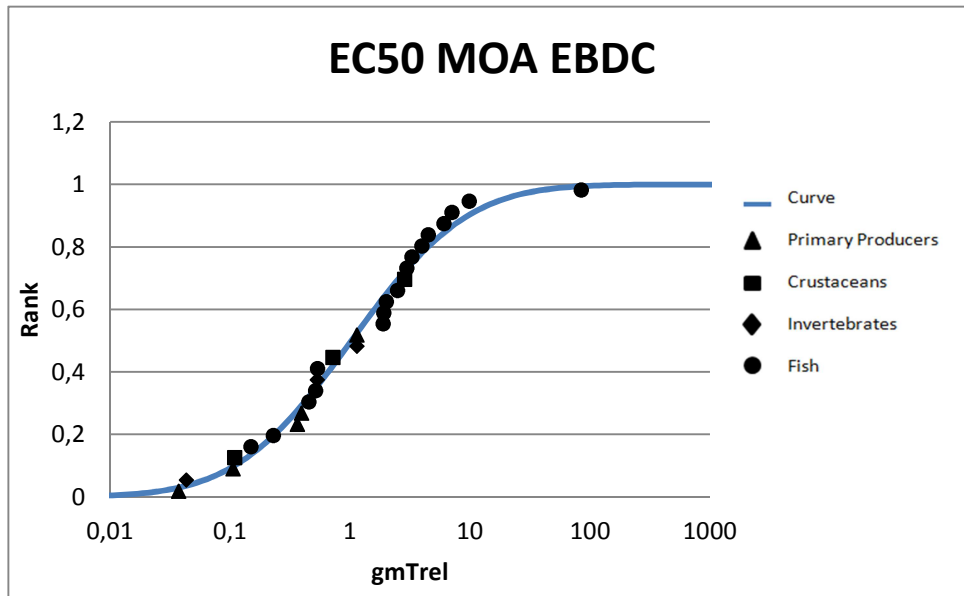


Figure 5 - Species sensitivity distribution curves (SSD) based on acute toxicity data for mode of action EBDC.

In the case of the sterol biosynthesis inhibiting mode of action, on the other hand, our conclusions are not coincidental with the ones from the study mentioned above, as in our study, fish turned out to be less sensitive than primary producers but more sensitive than invertebrates (Figure 6).

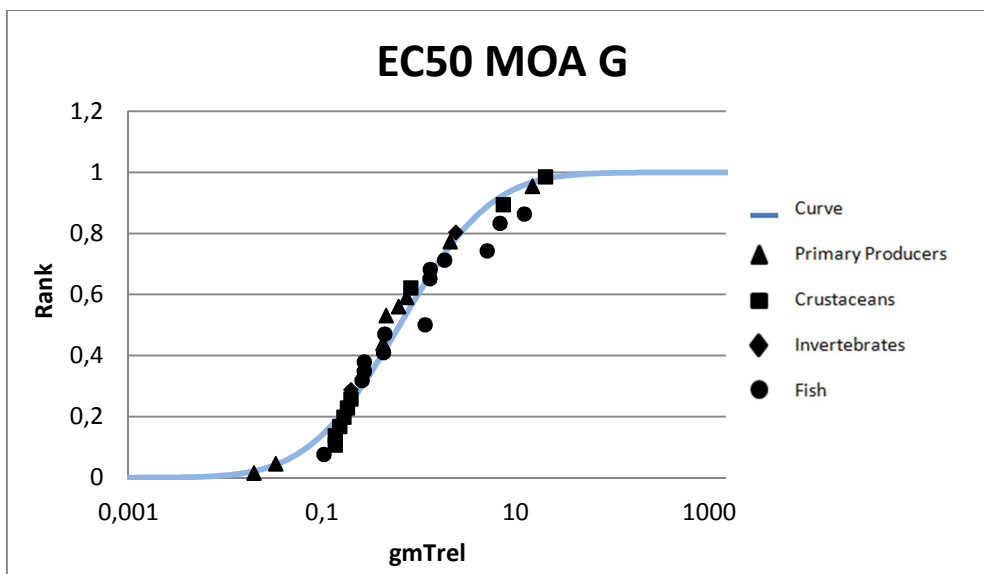


Figure 6 - Species sensitivity distribution curves (SSD) based on acute toxicity data for mode of action G.

To non-EBDC fungicides, the most sensitive taxonomic group was the invertebrates, followed by fish, which also does not match the results from Maltby's study (Figure 7).

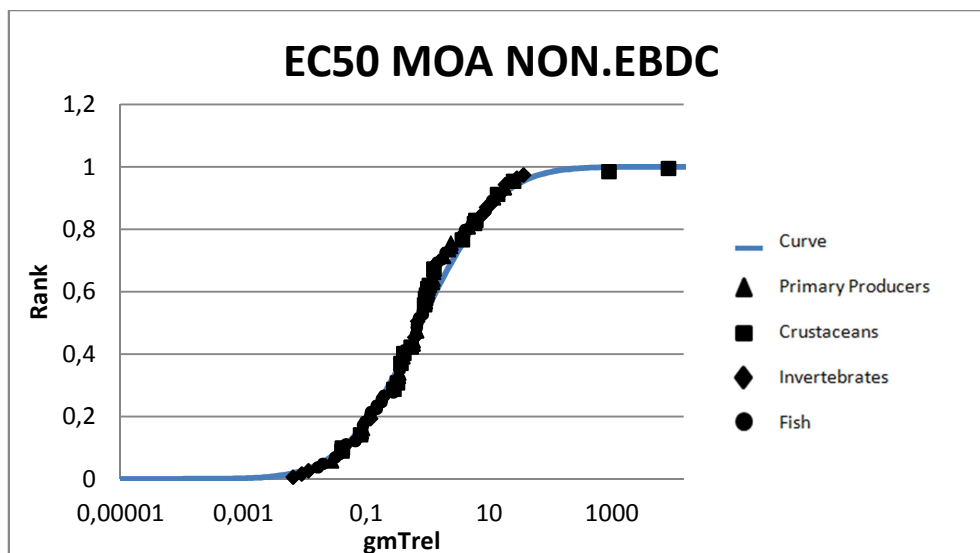


Figure 7 - Species sensitivity distribution curves (SSD) based on acute toxicity data for mode of action non-EBDC.

In order to identify if the utilized standard species protect their respective taxonomic groups, the data was separated into the fungicides' mode of action and taxonomic groups, and from that the SSD curves were calculated, one per mode of action, with each species marked individually for each one.

This way, the information on which is the most sensitive species was obtained per mode of action, e.g. on the mode of action A, the most sensitive species (from the ones for which data were available) is a crustacean with the scientific name of *Belanus amphrite ssp. amphrite*, and the least sensitive is a fish with the scientific name of *Ostrichthyes*.

To evaluate the level of protection provided by the standard species, the PAF (Potentially Affected Fraction) and PAF-UF (Potentially Affected Fraction with Uncertainty Factor) (Table 4) were calculated.

The value of PAF to *P. subcapitata* is the percentage of species that are affected if we use this specie as representative specie, e.g., if we use *O. mykiss* as representative specie in mode of action G, 66% of species will be affected, PAF-UF is the value of the margin of error of this estimate.

Table 4 – PAF (Potential Affected Fraction) values

MOA	<i>P. subcapitata</i>		<i>O. mykiss</i>	
	PAF	PAF-UF	PAF	PAF-UF
A	0,2129555	0,0229017	0,413065	0,0043752
B	0,5627703	0,2184327	0,3064917	0,0087315
C	0,1964575	0,0374983	0,2320893	0,0048793
D	0,0591077	0,0181153	0,8490313	0,4873343
E	0,1219518	0,0042129	0,5619193	0,0026961
F	0,0752182	0,0060671	0,3835687	0,0074137
G	0,4080024	0,0569809	0,6625579	0,0114098
EBDC	0,0313973	0,0007363	0,317827	0,0009274
Non-EBDC	0,4737280	0,141043	0,3675677	0,0091921
Unknown	0,1083672	0,0237467	0,9042738	0,4258555

From this, it could be concluded that there are modes of action for which the standard species do not protect the entire taxonomic group. For mode of action D (amino acids and protein synthesis), which is the mode of action that reveals the biggest difference between representativeness of *O. mykiss* and *P. subcapitata*, by only using *O. mykiss* as a standard test species, approximately 85% of the fish population is affected (Figure 8).

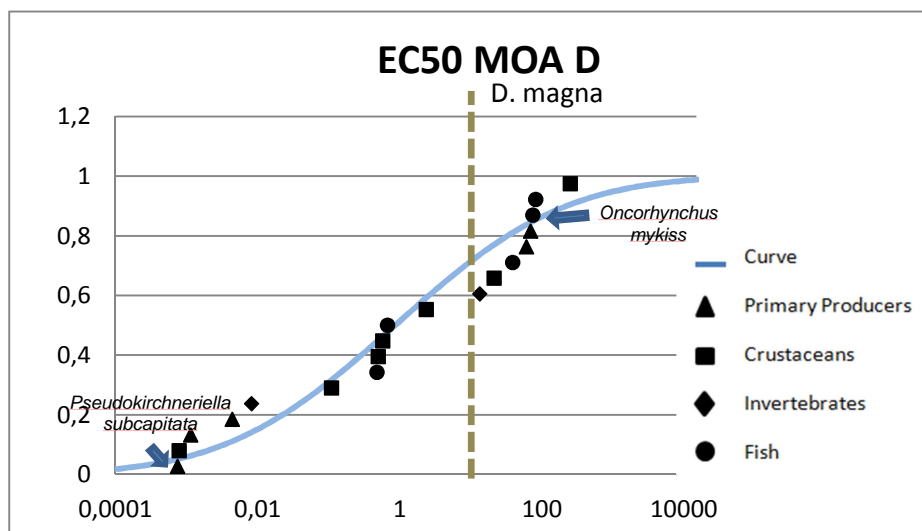


Figure 8 - Species sensitivity distribution curves (SSD) based on acute toxicity data for mode of action D.

This clearly reveals that for fungicides' with this mode of action, using *O. mykiss* is not representative and protective for the other taxa belonging to this taxonomic group. The same applies to other modes of action such as group B, G and non-EBDC for primary producers, where *P. subcapitata* is not representative and also to groups G and E for fish, where *O. mykiss* also is not representative. Due to the flow data for NOEC values, it was only possible to draw conclusions from the data that refers to acute toxicity.

3.5 Conclusions

The main objectives of this study were to verify the relative sensitivities of taxonomic groups towards the fungicides' different modes of action and also ascertain which species are the most sensitive and appropriate to use as standard species on environmental risk assessments.

From this investigation we can conclude:

- The fungicides' mode of action has an influence on which is the most sensitive taxonomical group
 - For the acute toxicity data, and for the majority of the fungicides' modes of action, the taxonomical group that presents the greatest sensitivity is the primary producers, however, modes of action A, B and non-EBDC are exceptions.
 - For mode of action A, the most sensitive taxonomical group is the crustaceans, for mode of action B it is the fish, and for the non-EBDC group it is the invertebrates.
 - The standard species *P. subcapitata* is not representative of the taxonomical group for modes of action B, G and non-EBDC, as the PAF (Potentially Affected Fraction) value is greater than 40% for any of them.

The standard species also turned out to not be a good standard species for the modes of action A, D, E and G, as it always generated a PAF value greater than 40

3.6 References

Alan Wood Database, 2010. Compendium of Pesticides Common Names 2010.

Brock, T.C.M., Van Wijngaarden, R.P.A., 2012. Acute toxicity tests with *Daphnia magna*, *Americamysis bahia*, *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex* and implications of new EU requirements for the aquatic effect assessment of insecticides. Environ. Sci Pollut Res. DOI 10.1007/s11356-012-0930-0.

Daam, M.A., Van den Brink, P.J., 2011. Risk Assessment of Agrochemicals on Irrigation Water Quality. Acta Horticulturae. 922, 41-47.

EC, 2000. Directive 2000/60/EC of the European parliament and of the council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Off. J. Eur. Comm. 327, 1-73.

EC, 2009. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European parliament and the council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Off. J. Eur. Union 309, 1-50.

EC, 2011. Commission Regulation (EU) No 544/2011 of 10 June 2011 implementing Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council as regards the data requirements for active substances. Off. J. Eur. Union 155, 1-66.

EC, 2013. Commission Regulation (EU) No 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. Off. J. Eur. Comm. 93, 1-85.

EFSA, 2013. DRAFT Guidance Document on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues, EFSA Journal 2013; volume (issue): NNNN

FRAC (2012). List of Fungicide Common Names – 2012. Fungicides Resistance Action Committee. Available via: <http://www.frac.info/publication/anhang/2012%20FRAC%20List%20Fungicide%20Common%20Names.pdf>

Maltby, L., Blake, N., Brock, T.C.M., Van den Brink, P.J., 2005. Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 24, 379-388.

Maltby, L., Brock, T.C.M., Van den Brink, P.J., 2009. Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: Importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7556–7563

SANCO, 2002. Guidance document on aquatic ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, SANCO/3268/2001 rev. 4 (final), Brussels, Belgium.

SANCO, 2010. Commission Regulation (EU) No .../... of [...] amending Commission Regulation (EU) No xxxx/2010 laying down the requirements for the dossier to be submitted for the approval of active substance contained in plant protection products. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, SANCO/11802/2010 rev. 00, Brussels, Belgium.

Van den Brink, P.J., Blake, N., Brock, T.C.M., Maltby, L., 2006. Predictive value of species sensitivity distributions for effect of herbicides in freshwater ecosystems. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 12, 645-674.

Van den Brink, P.J., Blake, N., Brock, T.C.M., Maltby, L., 2006. Predictive value of species sensitivity distributions for effect of herbicides in freshwater ecosystems. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 12, 645-674.

Van Vlaardingen, P., Traas, T.P., Aldenberg, T., Wintersen, A.M., 2004. ETX 2.0. A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed toxicity data. RIVM 2004

4. Conclusões

Os objetivos principais deste trabalho foram verificar a sensibilidade relativa dos grupos taxonómicos aos diferentes modos de ação dos fungicidas e ainda averiguar quais as espécies aquáticas mais sensíveis e mais apropriadas para utilizar como espécies padrão em avaliações de risco ambiental para sistemas aquáticos.

Com a elaboração deste estudo pôde concluir-se que:

- O modo de ação dos fungicidas tem influência no grupo taxonómico mais sensível
- Para os dados de toxicidade aguda, e para a maioria dos modos de ação de fungicidas o grupo taxonómico que apresenta maior sensibilidade é o grupo dos produtores primários, contudo, as exceções estão nos modos de ação A, B e non-EBDC.
- No modo de ação A o grupo taxonómico mais sensível são os crustáceos, no modo de ação B são os peixes e no grupo dos non-EBDC são os invertebrados.
- Relativamente às espécies utilizadas como espécies padrão, a *P. subcapitata* não é representativa do grupo taxonómico para os modos de ação B, G e non-EBDC pois o valor da PAF (Fração Potencialmente Afetada) é em qualquer um destes casos é superior a 40%.
- A espécie *O. mykiss* também não se revelou uma boa espécie padrão para os modos de ação A (*nucleic acids synthesis*), D (*amino acids and protein synthesis*), E (*signal transduction*) e G (*sterol biosynthesis in membranes*) onde apresentava um valor de PAF sempre superior a 40%.

Referências Bibliográficas

Arts, G.H.P., Belgers, J.D.M., Hoekzema, C.H., Thissen, J.T.N.M., 2008. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environ Pollut* 153, 199-206.

Brock, T.C.M., Van Wijngaarden, R.P.A., 2012. Acute toxicity tests with *Daphnia magna*, *Americamysis bahia*, *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex* and implications of new EU requirements for the aquatic effect assessment of insecticides. *Environ. Sci Pollut Res.* DOI 10.1007/s11356-012-0930-0.

Crossland, N.O., Heimbach, F., Hill, I.R., Boudou, A., Leeuwangh, P., Matthressen, P., Persoone, G., 1992. Summary and recommendations of the European Workshop on Freshwater Field Tests (EWOFFT), Potsdam, Germany.

Daam, M.A., Van den Brink, P.J., 2011. Risk Assessment of Agrochemicals on Irrigation Water Quality. *Acta Horticulturae.* 922, 41-47.

Daam, M.A., Silva, E., Leitão, S., Cerejeira, M.J., 2009. Environmental risk assessment of pesticides in Mediterranean Portugal: Status and research needs. In: *Advances in environmental research* 9, ISBN: 978-1-61728-999-6

EC, 2000. Directive 2000/60/EC of the European parliament and of the council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Comm.* 327, 1-73.

EC, 2009. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European parliament and the council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Off. J. Eur. Union* 309, 1-50.

EC, 2011. Commission Regulation (EU) No 544/2011 of 10 June 2011 implementing Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council as regards the data requirements for active substances. *Off. J. Eur. Union* 155, 1-66.

EC, 2013. Commission Regulation (EU) No 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. *Off. J. Eur. Union* 93, 1-84.

EFSA, 2013. DRAFT Guidance Document on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues, *EFSA Journal* 2013; volume (issue): NNNN

- Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Haverland, P.S., Carlson, A.R., 1997. Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Arch Environ Contam Toxicol* 32, 353-357
- Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Carlson, A.R., 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environ Toxicol Chem* 17, 1830-1834
- Giddings, Ph.D.J.M., Arts, Ph.D.G., Udo Hommen, Ph.D., 2012. The Relative Sensitivity of Macrophyte and Algal Species to Herbicides and Fungicides: An Analysis Using Species Sensitivity Distributions. *Int. Environ. Assess. Manag.* DOI 10.1002/ieam.1387
- Maltby, L., Brock, T.C.M., Van den Brink, P.J., 2009. Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: Importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7556–7563
- OCDE, 1984. Fish, prolonged toxicity test: 14 – Day study, Test Guideline 204, OCDE Guidelines for the testing of chemicals. OCDE, Paris.
- OCDE, 2000. Fish, Juvenile growth test, Test Guideline 215, OCDE Guidelines for testing of chemicals. OCDE, Paris.
- SANCO, 2002. Guidance document on aquatic ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, SANCO/3268/2001 rev. 4 (final), Brussels, Belgium.
- SANCO, 2010. Commission Regulation (EU) No .../... of [...] amending Commission Regulation (EU) No xxxx/2010 laying down the requirements for the dossier to be submitted for the approval of active substance contained in plant protection products. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, SANCO/11802/2010 rev. 00, Brussels, Belgium.
- Solomon, K.R., Brock, T.C.M., De Zwart, D., Dyer, S.D., Posthuma, L., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K., and Van den Brink, P.J., 2008. Extrapolation in the context of criteria setting and risk assessment. In: Solomon, K.R., Brock, T.C.M., De Zwart, D., Dyer, S.D., Posthuma, L., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K., and Van den Brink, P.J., (eds.). *Extrapolation Practice for Ecotoxicological Effect Characterization of Chemicals*, SETAC Europe Press, Brussels, Belgium, 1-32.
- Vervliet-Scheebaum, M., Knauer, K., Maund, S.J., Grade, R., Wagner, E., 2006. Evaluating the necessity of additional aquatic plant testing by comparing the sensitivities of different species. *Hydrobiol* 570, 231-236.