



Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Instituto de Ciências Biológicas

Pós-Graduação em Biologia de Ambientes

Aquáticos Continentais



Toxicidade do tebuconazol em quatro espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais.

Savênia Bonoto da Silveira

Orientador: Prof. Dr. Danilo Girolto

Rio Grande

2012



Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



**Toxicidade do tebuconazol em quatro espécies
fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais.**

Aluno: Savênia Bonoto da Silveira

Orientador: Prof. Dr. Danilo Giroldo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande

2012

Agradecimentos

- ✓ Ao meu orientador, Prof. Dr. Danilo Giroldo, pela orientação, ensinamentos, confiança e oportunidade que me permitiu a execução deste trabalho;
- ✓ Agradeço a FURG e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Ambientes Aquáticos Continentais pela formação acadêmica;
- ✓ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo suporte financeiro;
- ✓ Aos membros da Banca Examinadora: Dr^a Marta Marques de Souza e Dr. Sérgio Luiz de Oliveira Machado pelas críticas e sugestões;
- ✓ Ao pessoal do laboratório de limnologia pelo espaço cedido;
- ✓ Ao prof. Dr. Ednei Primel e Msc. Sergiane Caldas da Escola de Química e Alimentos - FURG que colaboraram com as determinações do tebuconazol;
- ✓ Aos amigos do grupo fito: Mirian (co-autora), Dani, Daniéle, Tchana, Lucas e Pablo pelas discussões, momentos de descontração, companhia e diversão nos congressos;
- ✓ Aos companheiros de almoço, Cris, Ju, Mirian (novamente) e Mauro pela amizade e convivência;
- ✓ A todo pessoal do laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos, em especial as queridíssimas fito-girls, obrigada pelos fito-eventos com muita, mas muita descontração;

- ✓ A Lisa, amiga querida, que me ajudou muito no inglês, amiga com quem eu chorei, conversei e sorri muito, muito;
- ✓ As minhas queridas amigas Aline, Flávia, Marcela, Michelle, Valéria e Vivi pelo apoio, amizade e carinho;
- ✓ À toda minha família: primos, primas, tios, tias, avó (a qual perdi durante este tempo) e afilhada pelo incentivo durante minha vida;
- ✓ A Manuxa, pelo cuidado, dedicação e carinho que tem comigo;
- ✓ Um agradecimento especial aos meus pais, por toda dedicação, ensinamentos, amor, apoio, confiança e incentivo durante toda minha vida;
- ✓ Ao meu “Negrinho” pelo carinho que tem comigo.

Sumário

Resumo	6
Abstract.....	7
1. Introdução.....	8
2. Objetivo	14
3. Referências Bibliográficas.....	15
4. Manuscrito a ser submetido ao Periódico Journal of Phycology	19
4.1 Resumo	20
4.2 Introdução	21
4.3 Material e Métodos	23
4.3.1 Organismos e Condições de Cultivo.....	23
4.3.2 Experimentos	24
4.3.3 Amostragem.....	25
4.3.4 Análises de Toxicidade.....	26
4.3.5 Análises Estatísticas.....	27
4.4 Resultados	27
4.4.1 Crescimento Celular	27
4.5 Discussão	43
4.6 Conclusões.....	49
4.7 Referências Bibliográficas	50
4.8 Anexos.....	55

Resumo

A contaminação de ambientes aquáticos por compostos potencialmente tóxicos oriundos de atividades agrícolas é um problema que tem se agravado nos últimos anos. O tebuconazol é um fungicida amplamente usado na agricultura, frequentemente encontrado em águas naturais, inclusive no Rio Grande do Sul, e cuja toxicidade para o fitoplâncton não é conhecida. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do tebuconazol em quatro espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais. Foram montadas culturas estanque em triplicata testando seis diferentes concentrações de tebuconazol (10; 100; 500; 1.000; 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) para *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Desmodesmus communis*, *Pediastrum boryanum* e *Spondylosium pygmaeum*, assim como um controle somente com a microalga, sem a adição do tebuconazol, para verificar o crescimento padrão. Os experimentos foram mantidos por 13 dias, nos quais foram realizadas amostragens diárias nos 4 primeiros dias e a cada 72 h até o final do experimento para a análise de crescimento (clorofila-a e densidade celular) e parâmetros toxicológicos. As quatro cepas apresentaram diferença significativa de crescimento em relação ao controle, para *C. depressum* var. *planctonicum* nas concentrações 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, *D. communis* e *P. boryanum* em 1.000, 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e *S. pygmaeum* a partir de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A EC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento) foi de 3.616 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *C. depressum* var. *planctonicum*, 3.246 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *D. communis*, 3.863 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *P. boryanum* e 1.851 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *S. pygmaeum*, sendo o *S. pygmaeum* a cepa mais sensível. Para LOEC (concentração mais baixa com efeito observado) e NOEC (concentração mais alta sem efeito observado) *S. pygmaeum* também apresentou concentrações mais baixas, seguido de *C. depressum* var. *planctonicum*, *D. communis* e *P. boryanum*.

Palavras-chave: Fungicida, Chlorophyta, Inibição e Sensibilidade.

Abstract

Public concern has increased regarding the uncontrolled use of pesticides, including fungicides. Tebuconazol is a broad-spectrum fungicide that is used worldwide; however, its toxicity to phytoplankton is unknown. This work aims to evaluate the tebuconazol influence on the growth of four subtropical freshwater phytoplanktonic strains. Experimental cultures of *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Desmodesmus communis*, *Pediastrum boryanum* and *Spondylosium pygmaeum* were prepared with six tebuconazol concentrations (10, 100, 500, 1.000, 5.000 and 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$), besides a control that was also prepared to measure the regular growth of each microalgae. The cultures (triplicates) were maintained for 13 days to determine both the growth (cellular density and chlorophyll-a content) and toxicological parameters. Tebuconazol inhibited the growth of all phytoplanktonic strains when they were exposed to 5.000 and 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$. *D. communis* and *P. boryanum* were also inhibited when exposed to 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, while *S. pygmaeum* was inhibited since 500 to 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$. The calculated EC50 was 3.616 $\mu\text{g L}^{-1}$ to *C. depressum* var. *planctonicum*, 3.246 $\mu\text{g L}^{-1}$ to *D. communis*, 3.863 $\mu\text{g L}^{-1}$ to *P. boryanum* and 1.851 $\mu\text{g L}^{-1}$ to *S. pygmaeum*, that was the most sensible strain to tebuconazol. LOEC and NOEC were also lower to *S. pygmaeum* followed by *C. depressum* var. *planctonicum*, *D. communis* and *P. boryanum*.

Key words: Fungicide, Chlorophyta, Inhibition and Sensibility.

1. Introdução

Fitoplâncton é o conjunto de organismos aquáticos microscópicos fotossintéticos adaptados a viver parcialmente ou continuamente em águas abertas. Nos ambientes aquáticos, especialmente em águas de maior profundidade, constituem o principal grupo de organismos fotossintetizantes, constituindo a base das cadeias alimentares junto com os demais produtores primários (Van den Hoek *et al.* 1995; Reynolds 2006). Estes organismos apresentam adaptações para a vida no plâncton como redução do tamanho, diferentes formas, formação de cadeias, presença de protuberâncias e expansões, controle da composição iônica, reserva de óleo, presença de mucilagem e presença de vesículas gasosas (Reynolds *et al.* 2002).

A comunidade fitoplanctônica consiste num conjunto diversificado de algas. Os principais grupos com representantes no plâncton de água doce são as cianobactérias (Divisão Cyanobacteria), as algas verdes (Divisão Chlorophyta), as diatomáceas (Divisão Ochrophyta, Classe Bacillariophyceae), as crisofíceas (Divisão Ochrophyta, Classe Chrysophyceae), os dinoflagelados (Divisão Dinophyta) e as euglenofíceas (Divisão Euglenophyta) (Van den Hoek *et al.* 1995; Esteves 1998; Reynolds 2006). Estes grupos têm necessidades fisiológicas diferentes e respondem de modo distinto às variáveis físicas e químicas como a luz, a temperatura e o regime de nutrientes. Apesar desta diversidade taxonômica e fisiológica, muitas espécies de algas podem coexistir num mesmo corpo de água. No entanto, os grupos dominantes entre as algas variam não só no espaço (verticalmente e horizontalmente), mas também sazonalmente, à medida que as condições físicas, químicas e biológicas da massa d'água se alteram (Wetzel 1993). Diversos fatores ambientais interagem na regulação do crescimento populacional e na distribuição espacial e temporal do fitoplâncton, e alguns deles desempenham ainda

funções críticas na sucessão das populações algais (Reynolds 1984; Harris 1987), dentre eles os compostos tóxicos.

As atividades agrícolas e industriais levam a síntese de compostos químicos, sobretudo orgânicos, que apresentam configurações estruturais envolvendo átomos ou grupos funcionais pouco ou nunca encontrados naturalmente. Qualquer composto encontrado na natureza acima de seus limites normais caracteriza-se como contaminante e, no momento em que tais níveis propiciem prejuízo a qualquer recurso ambiental, ele passa a ser considerado um poluente (Zagatto e Bertolletti 2006). Uma vez introduzidos no ambiente, estes compostos denominados xenobióticos podem tornar-se poluentes caso determinem efeitos indesejáveis em consequência de sua toxicidade e concentração (Zagatto e Bertolletti 2006).

A contaminação dos mananciais de água por compostos potencialmente tóxicos é um problema ambiental que tem se agravado nos últimos anos em virtude da intensa atividade agrícola. Com o crescimento demográfico, a demanda de alimentos aumentou e, para garantir alimentos suficientes e de qualidade à população, faz-se o uso de agrotóxicos (Caldas e Souza 2000; Sanches *et al.* 2003). Por um lado eles cumprem o papel de proteger as culturas agrícolas e propiciar maior produtividade e conseqüentemente ampliar a produção de alimentos, mas por outro, com o seu uso indiscriminado e pouco criterioso, traz problemas sérios para o ambiente e para a saúde humana.

De acordo com a Lei Federal 7.802/1989 dos Agrotóxicos, estes só poderão ser produzidos, manipulados, importados, exportados, comercializados e utilizados no território nacional se previamente registrados no órgão federal competente, atendidas as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores de agricultura,

saúde e meio ambiente. O Decreto Federal nº 4.074/2002 regulamenta a Lei Federal e determina que, para o registro de qualquer produto novo e a reavaliação dos já existentes no mercado, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), deverá realizar uma avaliação toxicológica do produto, baseada na Portaria nº 03/MS/SNVS, de 16/01/1992. O registro do agrotóxico é então efetuado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Também de grande importância é a avaliação do risco ambiental dos agrotóxicos, definindo suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental, sendo esta análise realizada pelo Ministério do Meio Ambiente através do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA) com o uso da Portaria nº 84, 15/10/1996. Apesar das legislações vigentes, o controle na comercialização dos agrotóxicos ainda é precário, assim como a falta de informações ou mesmo o descaso com os cuidados que deveriam ser adotados durante o uso destes produtos, comprometendo o meio ambiente e a saúde humana.

Os principais produtos usados comercialmente são compostos sintéticos com alta atividade biológica, entre estes se destacam os inseticidas, fungicidas e herbicidas que em geral são tóxicos. Dentre estes produtos encontra-se o tebuconazol, um fungicida amplamente usado na agricultura, principalmente em cereais (Calza *et al.* 2002), o qual foi testado no presente trabalho e que vem sendo registrado em sistemas aquáticos da região sul do Rio Grande do Sul (Cabrera *et al.* 2008; Demoliner *et al.* 2010). Os fungicidas são utilizados para o controle de fungos patogênicos de diversas culturas, porém, podem erradicar ou influenciar uma grande diversidade de microorganismos considerados como organismos não-alvo.

O tebuconazol é um fungicida sistêmico do grupo químico triazol, que apresenta fórmula molecular $C_{16}H_{22}ClN_3O$ (Figura 1) e cujas propriedades físico-químicas, assim como outras informações, são descritas na Tabela 1.

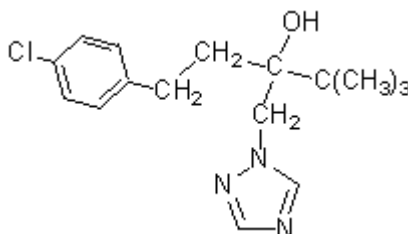


Figura 1: Fórmula estrutural do tebuconazol. (Resolução nº 160 de 19/01/10 (ANVISA)).

Tabela 1: Características gerais e propriedades físico-químicas do tebuconazol

Nome Químico (¹ IUPAC)	(RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol
Número do ²CAS	107534-96-3
Massa Molecular	307,8 g mol L ⁻¹ (Vicari 2009)
Solubilidade em água	36 mg L ⁻¹ (pH 5-9, 20 °C (Vicari 2009))
³K_{oc}	1000 mL g ⁻¹ (Silva <i>et al.</i> 2009)
⁴pKa	Nenhum (Vicari 2009)
⁵K_{ow}	5011,872 (Silva <i>et al.</i> 2009)
⁶t_{1/2} solo	100 dias (Silva <i>et al.</i> 2009)
t_{1/2} água	7 – 28 dias (Caldas <i>et al.</i> 2010)

¹IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês Internacional Union of Pure and Applied Chemistry

²CAS – Chemical Abstracts Service

³K_{oc} - Coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo

⁴pKa – Produto da constante de dissociação ácida

⁵K_{ow} – Coeficiente de partição octanol – água

⁶t_{1/2} - Tempo de meia vida

O principal mecanismo de ação do tebuconazol é a inibição da síntese do ergosterol (Tebuco, Arapongas, PR, Brasil, 2010), principal esterol da membrana plasmática da maioria dos fungos. O ergosterol é necessário para a manutenção da permeabilidade e fluidez da membrana (Sheehan *et al.* 1999), desta forma a sua ausência leva a perda de componentes citoplasmáticos e conseqüentemente à morte celular. Este fungicida é utilizado em vários tipos de culturas como arroz, aveia, banana, café, cenoura, cevada, citros, feijão, soja, tomate, trigo, uva entre outras. É um composto classificado como extremamente tóxico (Classe Toxicológica I), podendo causar danos à saúde humana, provocar irritação cutânea, ocular e respiratória; além de ser tóxico a muitos microorganismos aquáticos. A ingestão diária aceitável (IDA) deste composto é de 0,03 mg/Kg p.c. estabelecida na Resolução n° 160 de 19/01/10 (ANVISA). Os mecanismos de toxicidade em humanos não são conhecidos, mas em estudos de toxicidade animal do ingrediente ativo, tebuconazol, o fabricante do produto comercial Tebucor Nortox (Tebuco, Arapongas, PR, Brasil, 2010) aponta a possibilidade de haver efeitos tóxicos no baço, fígado, adrenais e cristalino dos olhos.

A contaminação por agrotóxicos ocorre tanto pontualmente como nas áreas adjacentes, podendo atingir até mesmo locais mais distantes do ponto de aplicação (Cabrera *et al.* 2008). As fontes de contaminação pontuais (efluentes líquidos) e difusas (lixiviação dos terrenos agrícolas, sedimentos e águas subterrâneas contaminadas, acidentes ambientais, águas pluviais) têm contribuído significativamente para as modificações ambientais, reduzindo a diversidade de espécies autóctones e aumentando desordenadamente a densidade de determinadas espécies indesejáveis (Zagatto e Bertolotti 2006).

Os agrotóxicos são particularmente tóxicos para muitas espécies de organismos não-alvo presentes em água doce, acarretando assim, alteração da composição de espécies de um ambiente aquático como resultado do estresse tóxico, podendo afetar a estrutura e função de todo o ecossistema (Verdisson *et al.* 2001). A toxicidade de agrotóxicos já foi demonstrada para alguns compostos em organismos aquáticos. Segundo Zubrod *et al.* (2010) o crustáceo *Gammarus fossarum* exposto ao fungicida tebuconazol apresentou diminuição na taxa de alimentação na concentração de 600 $\mu\text{g L}^{-1}$, CL_{50} na concentração de 1.347 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100% de mortalidade em 3.000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ma *et al.* (2008) mostraram que o inseticida isoprocarb (50 – 200.000 $\mu\text{g L}^{-1}$), acaricida propargite (1.000 – 2.000.000 $\mu\text{g L}^{-1}$), herbicida flumetralin (100 – 5.000.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) e o fungicida propiconazol (20 – 100.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram tóxicos para cianobactérias (*Anabaena flos-aquae*, *Microcystis flos-aquae* e *Microcystis aeruginosa*) e algas verdes (*Pseudokirchneriella subcaptata*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella pyrenoidosa*). Deng *et al.* (2012) mostraram que os herbicidas diuron (100 e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$), bensulfuron-methyl, diquat e s-metalochlor (100, 1.000 e 5.000 $\mu\text{g L}^{-1}$), fluridone (1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) e dinoterb (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) apresentaram inibição em relação ao crescimento de *Botryococcus braunii*. Toni *et al.* (2011) mostraram que a exposição da carpa (*Cyprinus carpio*) ao fungicida tebuconazol nas concentrações de 31,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ para teste de campo, 33,47 e 36,23 $\mu\text{g L}^{-1}$ para testes de laboratório causou mudanças no metabolismo da carpa.

Existem até o momento poucos trabalhos realizados sobre a toxicidade de agrotóxicos em microalgas isoladas de sistemas aquáticos brasileiros, especialmente os subtropicais, e não existem informações sobre os efeitos do fungicida tebuconazol sobre a comunidade fitoplanctônica, ficando clara a necessidade de investigar a influência do

tebuconazol sobre o fitoplâncton que é a base da cadeia alimentar e importante para manter o equilíbrio dos ambientes aquáticos. Este trabalho caracteriza-se como a primeira iniciativa para verificar o dano potencial que a aplicação ampla de tebuconazol pode gerar sobre a biota aquática, especialmente nos sistemas do extremo sul do Brasil de onde as microalgas usadas neste trabalho foram isoladas.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do fungicida tebuconazol em quatro espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais. Paralelamente, estabelecem-se os seguintes objetivos específicos:

- Determinar parâmetros de crescimento como rendimento total, taxa de crescimento e o tempo de duplicação da biomassa para cada espécie em cada concentração testada de tebuconazol;
- Determinar parâmetros toxicológicos do tebuconazol, como a inibição do crescimento, a concentração capaz de inibir 50% do crescimento efetivo (EC_{50}), concentração mais baixa com efeito observado (LOEC), concentração mais alta sem efeito observado (NOEC) e sensibilidade para cada microalga.

3. Referências Bibliográficas

- ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: Monografia dos Agrotóxicos. Tebuconazol. Resolução 160 de 19 de janeiro de 2010. **Diário Oficial da União, Brasília, DF. Publicado no DOU de 20 de janeiro de 2010.**
- BRASIL. Decreto Federal nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União, Brasília, DF. Publicado no DOU de 08 de janeiro de 2002.**
- BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 julho de 1989. Lei Federal sobre Agrotóxicos. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União, Brasília, DF. Publicado no DOU de 12 de julho de 1989.**
- BRASIL. Portaria nº 03/MS/SNVS, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins. **Diário Oficial da União, Brasília, DF. Publicado no DOU de 04 de fevereiro de 1992.**
- BRASIL. Portaria Normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996. Estabelece procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental de agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário Oficial da União, Brasília, DF. Publicado no DOU de 18 de outubro de 1996.**
- Cabrera, L., Costa, F. P. e Primel, E. G. 2008. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado RS. **Química Nova, 31:1982-1986.**
- Caldas, S. S., Demoliner, A., Costa, F. P., D'oca, M. G. M. e Primel, E. G. 2010. Pesticide residue determination in groundwater using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detector and liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society** **21:642-650**.
- Caldas, E. D. e Souza, L. C. K. 2000. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticida na dieta brasileira. **Saúde Pública**, **34:529-537**.
- Calza, P., Baudino, S., Aigotti, R., Baiocchi, C., Branca, P. e Pelizzetti, E. 2002. High-performance liquid chromatographic/tandem mass spectrometric identification of the phototransformation products of tebuconazole on titanium dioxide. **Journal of Mass Spectrometry**, **37:566-576**.
- Demoliner, A., Caldas, S. S., Costa, F. P., Gonçalves, F. F., Clementin, R. M., Milani, M. R. e Primel, E. G. 2010. Development and validation of a method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the determination of multiple classes of pesticides and metabolites in water samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society** **21:1424-1433**.
- Deng, L., Senseman, S. A., Gentry, T. J., Zuberer, D. A., Weiss, T. L., Devarenne, T. P. e Camargo, E. R. 2012. Effect of selected herbicides on growth and hydrocarbon content of *Botryococcus braunii* (Race B). **Industrial Crops and Products**, **39:154-161**.
- Esteves, F. A. 1998. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência, 602 p.
- Harris, G. H., 1987. *Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation*. London: Chapman and Hall, 384p.
- Ma, J., Chen, J., Wang, P. e Tong, S. 2008. Comparative sensitivity of eight freshwater phytoplankton species to isoprocarb, propargite, flumetralin and propiconazol. **Polish Journal of Environmental Studies** **17:525 – 529**.
- Reynolds, C. S. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, 384 p.
- Reynolds, C. S. 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press, 535 p.

- Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C. e Naselli-Flores, C. M. S. 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. **Journal of Plankton Research** **24:417-428**.
- Sanches, S. M., Silva, C. H. T. P., Campos, S. X. e Vieira, E. M. 2003. Pesticidas e seus respectivos riscos associados a contaminação da água. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente** **13:53-58**.
- Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A. e Sibley, C. M. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. **Clinical Microbiology Reviews** **12:40-79**.
- Silva, D. R. O., Avila, L. A., Agostinetto, D., Magro, T. D., Oliveira, E., Zanella, R. e Noldin, J. A. 2009. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, **39:2383-2389**.
- Tebuco. Concentração Emulsionável. Arapongas, PR. NORTOX. 2010. Bula.
- Toni, C., Loro, V. L., Santi, A., Menezes, C. C., Cattaneo, R., Clasen, B. E. e Zanella, R. 2011. Exposure to tebuconazol in Rice Field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, **153:128-132**.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G. e Johns, H. M. 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, 623 p. Verdisson, S., Couderchet, M. e Vernet, G. 2001. Effects of procymidone, fludioxonil and pyrimethanil on two non-target aquatic plants. **Chemosphere** **44:467-474**.
- Verdisson, S., Couderchet, M. e Vernet, G. 2001. Effects of procymidone, fludioxonil and pyrimethanil on two non-target aquatic plants. **Chemosphere** **44:467-474**.
- Vicari, M. C. 2009. Determinação de bispiribaque-sódico, quincloraque e tebuconazole em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE e HPLC-DAD. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. *Dissertação de mestrado*. 122 p.
- Wetzel, R. G. 1993. *Limnologia*. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian, 919 p.
- Zagatto, P. A. e Bertoletti, E. 2006. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. RiMa. São Carlos. 464 p.

Zubrod, J. P., Bundschuh, M. e Schulz, R. 2010. Effects of subchronic fungicide exposure on the energy processing of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **73:1674–1680**.

4. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF PHYCOLOGY (Fator de Impacto 2, 239)

TOXICIDADE DO TEBUCONAZOL EM QUATRO ESPÉCIES FITOPLANCTÔNICAS DULCÍCOLAS SUBTROPICAIS

Silveira, S. B.¹, Bicho, M. S.², Primel, E. G.³; Caldas, S. S.⁴; Girollo, D.⁵

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia dos Ambientes Aquáticos Continentais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96203-900

sbonoto@yahoo.com.br

² Programa de Pós-graduação em Biologia dos Ambientes Aquáticos Continentais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96203-900

³ Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96203-900

⁴ Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96203-900

⁵ Laboratório de Botânica Criptogâmica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96203-900 dmbgirol@furg.br

4.1 Resumo

A contaminação de ambientes aquáticos por compostos potencialmente tóxicos oriundos de atividades agrícolas é um problema que tem se agravado nos últimos anos. O tebuconazol é um fungicida amplamente usado na agricultura, frequentemente encontrado em águas naturais, inclusive no Rio Grande do Sul, e cuja toxicidade para o fitoplâncton não é conhecida. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do tebuconazol em quatro espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais. Foram montadas culturas estanque em triplicata testando seis diferentes concentrações de tebuconazol (10; 100; 500; 1.000; 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) para *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Desmodesmus communis*, *Pediastrum boryanum* e *Spondylosium pygmaeum*, assim como um controle somente com a microalga, sem a adição do tebuconazol, para verificar o crescimento padrão. Os experimentos foram mantidos por 13 dias, nos quais foram realizadas amostragens diárias nos 4 primeiros dias e a cada 72 h até o final do experimento para a análise de crescimento (clorofila-a e densidade celular) e parâmetros toxicológicos. As quatro cepas apresentaram diferença significativa de crescimento em relação ao controle, para *C. depressum* var. *planctonicum* nas concentrações 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, *D. communis* e *P. boryanum* em 1.000, 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e *S. pygmaeum* a partir de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A EC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento) foi de 3.616 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *C. depressum* var. *planctonicum*, 3.246 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *D. communis*, 3.863 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *P. boryanum* e 1.851 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *S. pygmaeum*, sendo o *S. pygmaeum* a cepa mais sensível. Para LOEC (concentração mais baixa com efeito observado) e NOEC (concentração mais alta sem efeito observado) *S. pygmaeum* também apresentou concentrações mais baixas, seguido de *C. depressum* var. *planctonicum*, *D. communis* e *P. boryanum*.

Palavras-chave: Fungicida, Chlorophyta, Inibição e Sensibilidade.

4.2 Introdução

A contaminação dos mananciais de água por compostos potencialmente tóxicos é um problema ambiental que tem se agravado nos últimos anos em virtude da intensa atividade agrícola. Com o crescimento demográfico, a demanda de alimentos aumentou, portanto, para garantir alimentos suficientes e de qualidade à população, faz-se o uso de agrotóxicos (Caldas e Souza 2000; Sanches *et al.* 2003). A contaminação por agrotóxicos ocorre tanto pontualmente como nas áreas adjacentes, podendo atingir até mesmo locais mais distantes do ponto de aplicação (Cabrera *et al.* 2008). Os agrotóxicos entram nos ecossistemas aquáticos por meio de atividades como a pulverização, lixiviação do solo, escoamento superficial e derramamentos acidentais (Ma *et al.* 2008).

Estes compostos são particularmente tóxicos para muitas espécies de organismos não-alvo presentes em água doce, acarretando assim, alteração da composição de espécies de um ambiente aquático como resultado do estresse tóxico podendo afetar a estrutura e função de todo o ecossistema (Verdisson *et al.* 2001). Dentre estes compostos potencialmente tóxicos encontra-se o tebuconazol, um fungicida amplamente usado na agricultura, principalmente em cereais (Calza *et al.* 2002), e que vem sendo registrado em sistemas aquáticos da região sul do Rio Grande do Sul (Cabrera *et al.* 2008; Demoliner *et al.* 2010).

O tebuconazol é um fungicida sistêmico do grupo químico triazol. É um composto caracterizado pelo mecanismo de inibição da síntese do ergosterol (Tebuco, Arapongas, PR, Brasil, 2010), principal esterol da membrana plasmática da maioria dos fungos. O ergosterol é necessário para a manutenção da permeabilidade e fluidez da membrana (Sheehan *et al.* 1999), desta forma a sua ausência levaria a perda de componentes

citoplasmáticos e conseqüentemente à morte celular. É um composto classificado como extremamente tóxico (Classe Toxicológica I), podendo causar danos à saúde humana, provocar irritação cutânea, ocular e respiratória; além de ser tóxico a muitos microorganismos aquáticos. A ingestão diária aceitável (IDA) deste composto é de 0,03 mg/Kg p.c. estabelecida na Resolução n° 160 de 19/01/10 (ANVISA).

A toxicidade de agrotóxicos já foi demonstrada para alguns compostos em organismos aquáticos. Segundo Zubrod *et al.* (2010) o crustáceo *Gammarus fossarum* exposto ao fungicida tebuconazol apresentou diminuição na taxa de alimentação na concentração de 600 µg L⁻¹, CL₅₀ na concentração de 1.347 µg L⁻¹ e 100% de mortalidade em 3.000 µg L⁻¹. Ma *et al.* (2008) mostraram que os agrotóxicos isoprocab, propargite, flumetralin e o propiconazol foram tóxicos para as cianobactérias (*Anabaena flos-aquae*, *Microcystis flos-aquae* e *Microcystis aeruginosa*) e algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella pyrenoidosa*). Deng *et al.* (2012) mostraram que os herbicidas diuron (100 e 1.000 µg L⁻¹), bensulfuron-methyl, diquat e s-metolochlor (100, 1.000 e 5.000 µg L⁻¹), fluridone (1.000 µg L⁻¹) e dinoterb (100 µg L⁻¹) apresentaram inibição em relação ao crescimento de *Botryococcus braunii*. Toni *et al.* (2011) mostraram que a exposição da carpa (*Cyprinus carpio*) ao tebuconazol nas concentrações de 31,95 µg L⁻¹ para teste de campo, 33,47 e 36,23 µg L⁻¹ para testes de laboratório causou mudanças no metabolismo. No entanto, existem até o momento poucos trabalhos realizados sobre a toxicidade de agrotóxicos em microalgas isoladas de sistemas aquáticos brasileiros, especialmente os subtropicais, e não existem informações sobre os efeitos do fungicida tebuconazol sobre a comunidade fitoplanctônica ficando clara, portanto, a necessidade de investigar a influência de

compostos de origem agrícola como o tebuconazol sobre o fitoplâncton que é a base da cadeia alimentar e importante para manter o equilíbrio dos ambientes aquáticos. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do fungicida tebuconazol em quatro cepas fitoplanctônicas subtropicais de água doce.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Organismos e Condições de Cultivo

Foram utilizadas neste trabalho quatro cepas da Divisão Chlorophyta (Figura 1), sendo duas pertencentes à Classe Chlorophyceae, Ordem Chlorococcales (*Desmodesmus communis* e *Pediastrum boryanum*) e duas pertencentes à Classe Zygnematophyceae, Ordem Desmidiatales (*Cosmarium depressum* var. *planctonicum* e *Spondylosium pygmaeum*).

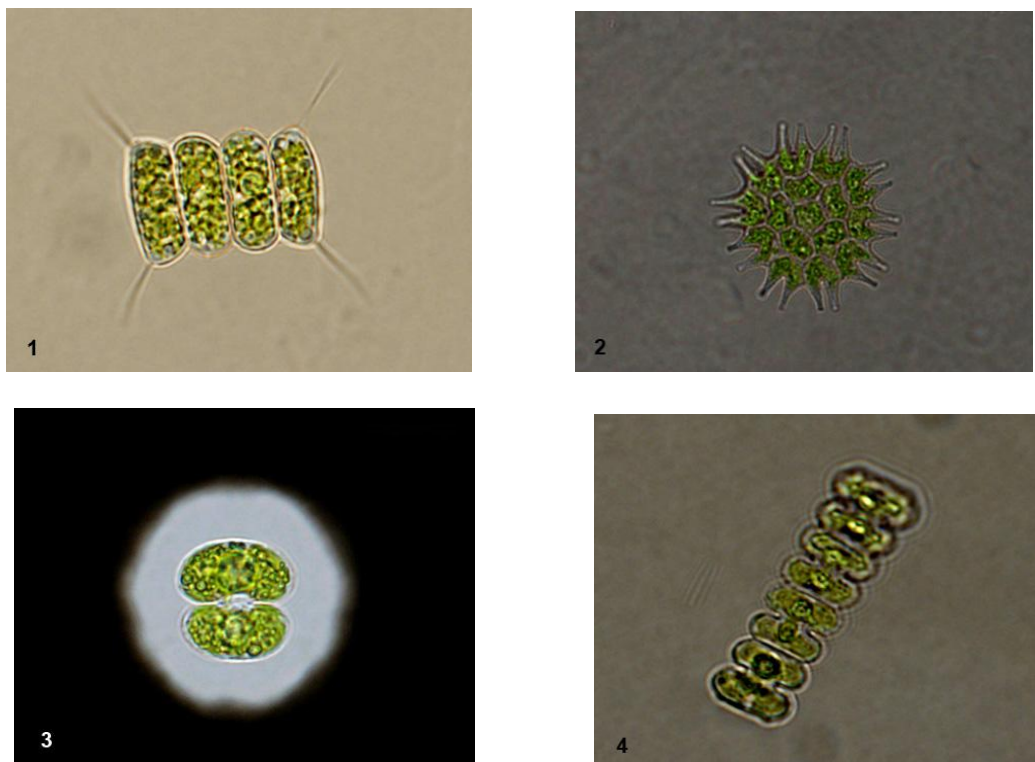


Figura 1: *Desmodesmus communis* (1), *Pediastrum boryanum* (2), *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* (3) e *Spondylosium pygmaeum* (4).

As quatro espécies utilizadas foram isoladas pela técnica da micro-manipulação ao microscópio a partir de amostras planctônicas coletadas de lagos subtropicais localizados entre as cidades de Rio Grande e Santa Vitória do Palmar, no extremo sul do Brasil. *Desmodesmus communis*, *C. depressum* var. *planctonicum* e *S. pygmaeum* foram isoladas de pequenos lagos (menos de 10.000 m²) localizados na Universidade Federal do Rio Grande – FURG na cidade de Rio Grande (32°04'23''S / 52°09'55''W, 32°04'20''S / 52°09'44''W e 32°04'39''S / 52°10'05''W), enquanto *P. boryanum* foi isolado a partir da Lagoa Mirim (32°52'44''S / 52°46'04''W) na cidade de Santa Vitória do Palmar. As cepas estão sendo mantidas na Coleção de Culturas de Microalgas Continentais do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande (CCMD-FURG).

Os inóculos e os experimentos foram mantidos em condições de luminosidade (aproximadamente 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), fotoperíodo (14:10h claro:escuro) e temperatura ($23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$) foram ajustadas em uma sala de incubação. O meio de cultura utilizado foi WC/2 (Guillard e Lorenzen 1972) em pH 7.0 (Anexo1).

A escolha das cepas cumpriu dois objetivos principais: (1) abranger diferentes classes taxonômicas, considerando a disponibilidade de culturas na CCMD-FURG (ICB) e (2) valer-se de gêneros tipicamente encontrados na região e associados tanto a ambientes oligotróficos, portanto apresentando baixa tolerância à contaminação e eutróficos e, portanto, potencialmente mais resistentes a águas contaminadas.

4.3.2 Experimentos

Primeiramente foi preparado o inóculo para cada espécie adicionando 2 mL da cultura preexistente da coleção em 100 mL de meio de cultivo, que foi mantido por 10 dias. Posteriormente as culturas para o experimento foram preparadas em frascos

“Erlenmeyers” de 250 mL com 140 mL de meio de cultivo, nos quais foi adicionado um volume do inóculo correspondente à obtenção de uma densidade óptica final de 0,008 (absorbância), determinada em espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini – 1240, Kyoto, Japão) em um comprimento de onda de 680 nm, padronizando a concentração celular em todos os experimentos (Ma *et al.* 2006). Seis concentrações de tebuconazol foram testadas (10; 100; 500; 1.000; 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) e para a adição de tebuconazol foi utilizado o composto comercial Tebuco Nortox (Tebuco, Arapongas, PR, Brasil, 2010). Também foi montado em cada experimento um controle contendo somente a alga, sem a adição do fungicida, para observar o crescimento padrão da cepa em estudo. Devido à inexistência de um limite máximo admissível deste composto, assim como para seu grupo químico (triazol) em águas brasileiras, o qual deveria estar descrito na legislação brasileira (CONAMA, resolução n° 357, de 17 de março de 2005), as concentrações testadas foram escolhidas a partir de uma concentração abaixo do limite de ingestão diária aceitável estabelecida pela Resolução n° 160 de 19/01/10 (ANVISA) até uma concentração próxima a regularmente utilizada em lavouras de diversas culturas, conforme estabelecido pelo fornecedor (Anexo 2). Todas as culturas foram montadas em triplicata totalizando 21 culturas por experimento e foram mantidas por 13 dias nas condições de cultivo anteriormente descritas, com amostragens periódicas como descritas a seguir.

4.3.3 Amostragem

Alíquotas de 10 mL foram retiradas a cada 24 h durante os quatro primeiros dias e a cada 72 h até o final do experimento para a determinação de crescimento. Os 10 mL amostrados foram divididos em duas sub-frações, sendo que 5 mL foi fixado com lugol acético para determinar a densidade celular através de contagens em microscópio

óptico, com o auxílio de um hemocitômetro do tipo “improved Neubauer”. Foram considerados indivíduos as células ou colônias, dependendo da espécie. Paralelamente, outra sub-fração de 5 mL foi utilizada para a determinação do teor de clorofila-a que foi realizado após centrifugação em tubos “ependorfs” (1,5 mL) por 15 minutos a 15.000 RPM em uma centrífuga Sigma 2K15 (Osterode am Harz, Alemanha). O precipitado foi utilizado para a análise de clorofila-a após extração em metanol absoluto por 24 h no escuro a -4 °C. A concentração final de clorofila-a foi determinada pela leitura em espectrofotômetro (Shimadzu, UV mini – 1240, Kyoto, Japão) nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm, cujos valores foram transformados em microgramas de clorofila-a por litro, de acordo com a equação descrita por Mackinney (1941). O sobrenadante foi reservado para descontaminação do composto a ser realizado pelo Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM-FURG), para assim poder fazer o descarte do mesmo.

4.3.4 Análises de Toxicidade

A concentração que inibe 50 % do crescimento efetivo (EC_{50}) foi calculada em 4 dias de cultivo e no final do experimento através de uma regressão linear entre as concentrações utilizadas de tebuconazol e a porcentagem de inibição (Ma e Liang 2001). A porcentagem de inibição foi calculada a partir dos valores de densidade celular do controle em relação à densidade celular observada em cada concentração de tebuconazol.

A concentração mais baixa com efeito observado (LOEC) foi a primeira concentração a mostrar diferença significativa de crescimento em relação ao controle, enquanto a maior concentração sem efeito observado (NOEC) foi a concentração

imediatamente abaixo da LOEC (Saker e Neilan 2001). A sensibilidade foi calculada a partir do valor de EC_{50} , pois estes são inversamente proporcionais (Ma *et al.* 2006).

4.3.5 Análises Estatísticas

Foi aplicada uma análise de variância ANOVA bifatorial com teste *post-hoc* de Tukey HSD e nível de significância de 5% nos dados de densidade celular, visando analisar o crescimento das quatro cepas testadas durante o tempo de cultivo nas seis concentrações de tebuconazol e o controle. Para analisar se o tebuconazol influencia a velocidade de crescimento de cada cepa, foi aplicada uma análise de variância ANOVA “one-way” com teste *post-hoc* de Tukey HSD utilizando nível de significância de 5% para as taxas de crescimento observadas e o tempo de duplicação da biomassa nas seis concentrações a que cada cepa foi exposta (Fogg 1975). Para determinar a toxicidade em 96 horas e ao final do experimento foi aplicada uma análise de variância ANOVA “one-way” com teste *post-hoc* de Dunnett utilizando nível de significância de 5% comparando a densidade celular do controle com as concentrações. Para verificar se existe diferença na sensibilidade de cada cepa entre os dias 4 e 13 foi aplicado o teste “t” de Student utilizando nível de significância de 5%.

4.4 Resultados

4.4.1 Crescimento Celular

As Figuras 2 a 5 mostram respectivamente o crescimento de *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Desmodesmus communis*, *Pediastrum boryanum* e *Spondylosium pygmaeum* monitorados pela densidade celular. Todas as cepas mostraram uma fase exponencial de crescimento iniciada a partir do 4º dia, estendendo-se até o final dos experimentos para o controle e as concentrações de 10, 100, 500 e

1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, com uma exceção para *D. communis* na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ que apresentou uma fase estacionária no 10º dia de cultivo. Para as concentrações de 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ não houve crescimento celular com exceção de *C. depressum* var. *planctonicum* em 5.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, em que o crescimento exponencial também foi iniciado após 4º dia de experimento. As maiores densidades foram obtidas em *S. pygmaeum*, *D. communis* e *P. boryanum* respectivamente, enquanto que a menor densidade ocorreu para *C. depressum* var. *planctonicum*. Os resultados de densidade celular para todas as cepas mostraram que houve diferença significativa de crescimento entre as concentrações de tebuconazol durante os 13 dias de cultivo (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$). *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* não apresentou diferença significativa de crescimento entre o controle e as concentrações de 10, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, as concentrações de 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ mostraram densidades celulares significativamente menores no 13º dia de cultivo em 5.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (exceto em relação a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) e a partir do 7º dia cultivo em 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$. *Desmodesmus communis* não apresentou diferença significativa de crescimento entre o controle e as concentrações de 10, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, o crescimento foi inibido na concentração de 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir do 10º dia de cultivo, e a partir do 2º dia de cultivo nas concentrações de 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$. *Pediastrum boryanum* também não apresentou diferença significativa de crescimento entre o controle e as concentrações de 10, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, o crescimento foi inibido na concentração de 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ no 13º dia de cultivo e já no 2º dia de cultivo nas concentrações de 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$. A cepa que demonstrou maior inibição ao tebuconazol foi *S. pygmaeum* cujo crescimento foi inibido também na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir do dia 7º dia de cultivo, além das concentrações de 1.000, 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ que mostraram

morte celular já no tempo 0 de cultivo. As concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, não mostraram crescimento significativamente diferente em relação ao controle.

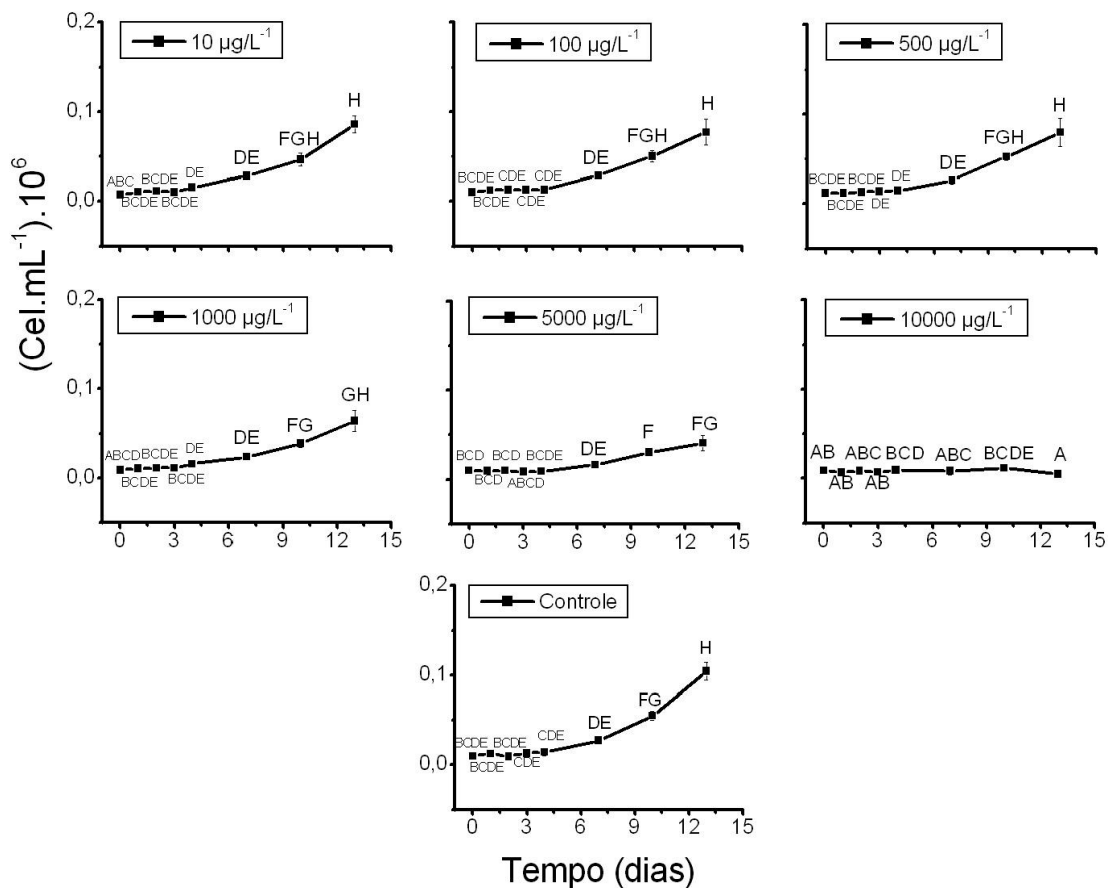


Figura 2: Densidade celular de *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de tebuconazol e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas de densidade celular (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$).

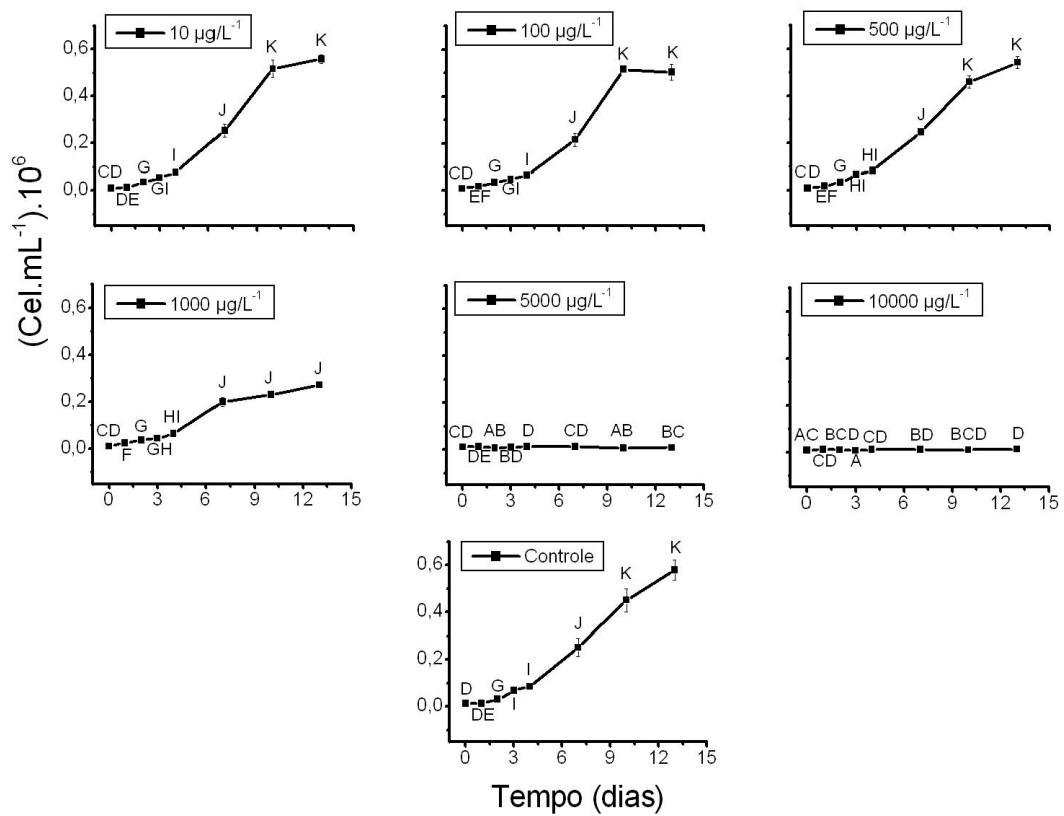


Figura 3: Densidade celular de *Desmodesmus communis* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de tebuconazol e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas de densidade celular (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$).

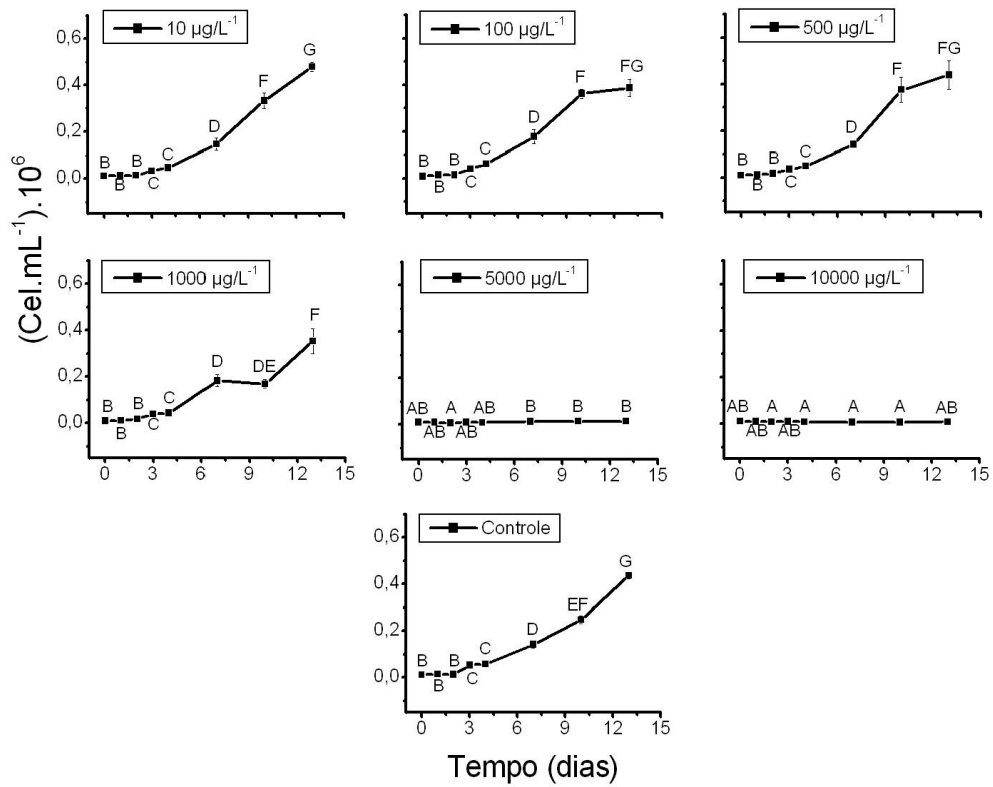


Figura 4: Densidade celular de *Pediastrum boryanum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de tebuconazol e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas de densidade celular (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$).

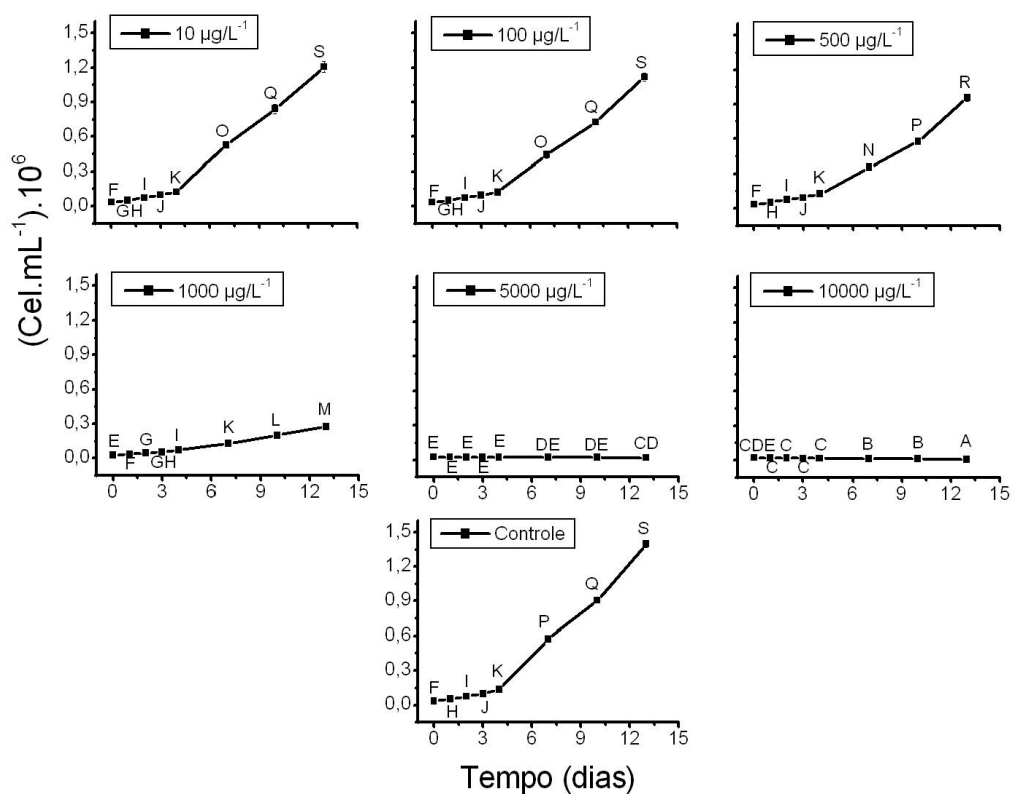


Figura 5: Densidade celular de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de tebuconazol e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas de densidade celular (ANOVA bifatorial, Tukey $p < 0,05$).

As Figuras 6 a 9 mostram respectivamente o crescimento de *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*, *Desmodesmus communis*, *Pediastrum boryanum* e *Spondylosium pygmaeum*, monitorados pelo teor de clorofila-a. Todas as cepas e concentrações que apresentaram crescimento tiveram a fase exponencial iniciada a partir do 4º dia. Esta fase se estendeu até o final do experimento para *C. depressum* var. *planctonicum*, com exceção da concentração de 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, e para *S. pygmaeum* com

exceção nas concentrações 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, pois não apresentaram crescimento. *Desmodesmus communis* nas concentrações de 10, 100, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e controle mostraram uma queda após o 7º dia e logo após um aumento na concentração de clorofila-a. Já para concentração de 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ após o 7º dia houve um declínio e para as concentrações de 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ não houve crescimento observado em *D. communis*. *Pediastrum boryanum* apresentou declínio para as concentrações 100, 500 e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir do 7º dia, e a partir do 10º dia para concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o controle. A concentração de 5.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentou um pequeno crescimento com queda a partir do 10º dia, enquanto 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ não apresentou crescimento em *P. boryanum*. A análise mostrou que as maiores concentrações de clorofila foram obtidas em *S. pygmaeum* e *C. depressum* var. *planctonicum*, enquanto as menores ocorreram em *D. communis* e *P. boryanum*.

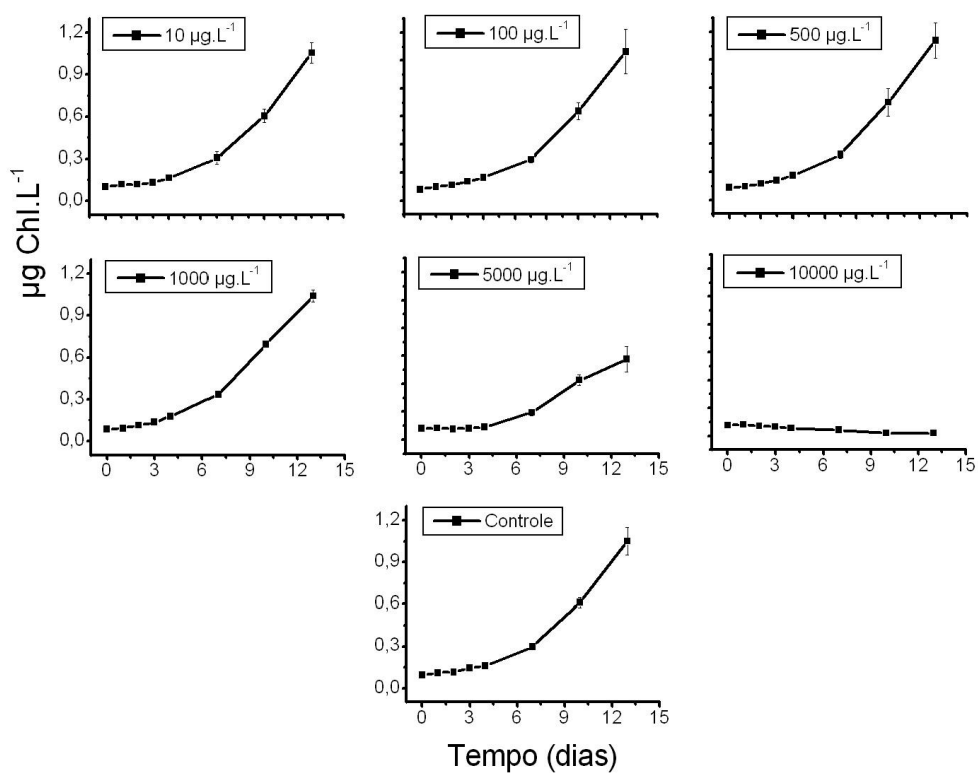


Figura 6: Concentração de clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de tebuconazol e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão.

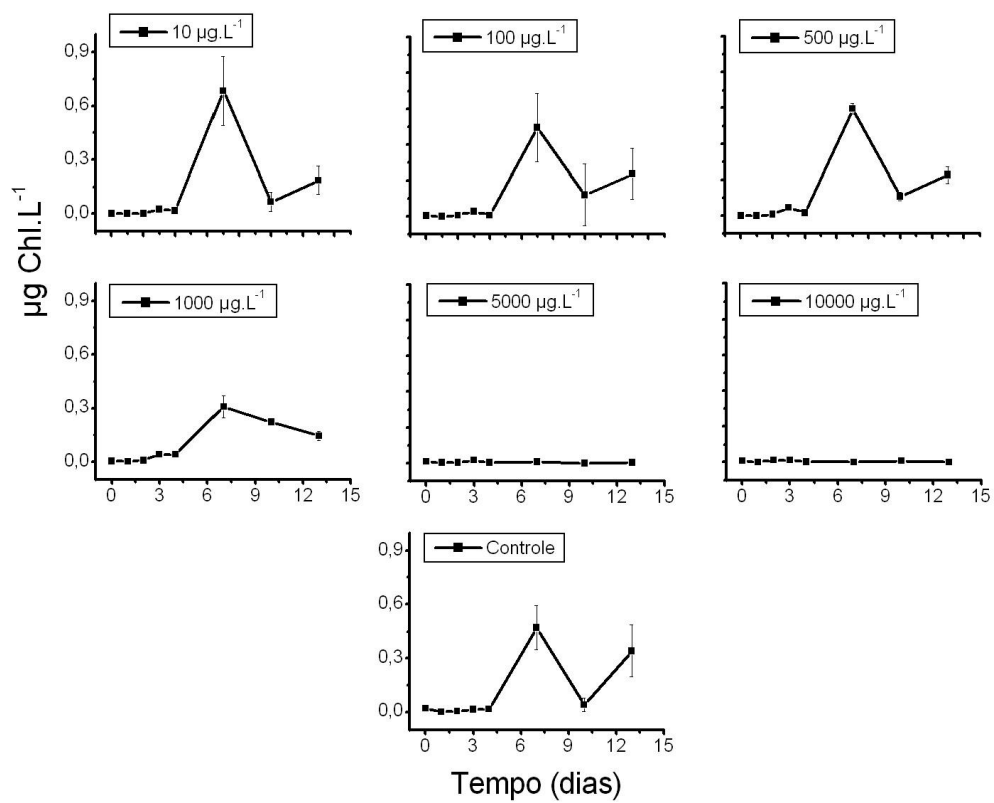


Figura 7: Concentração de clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de *Desmodesmus communis* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de tebuconazol e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão.

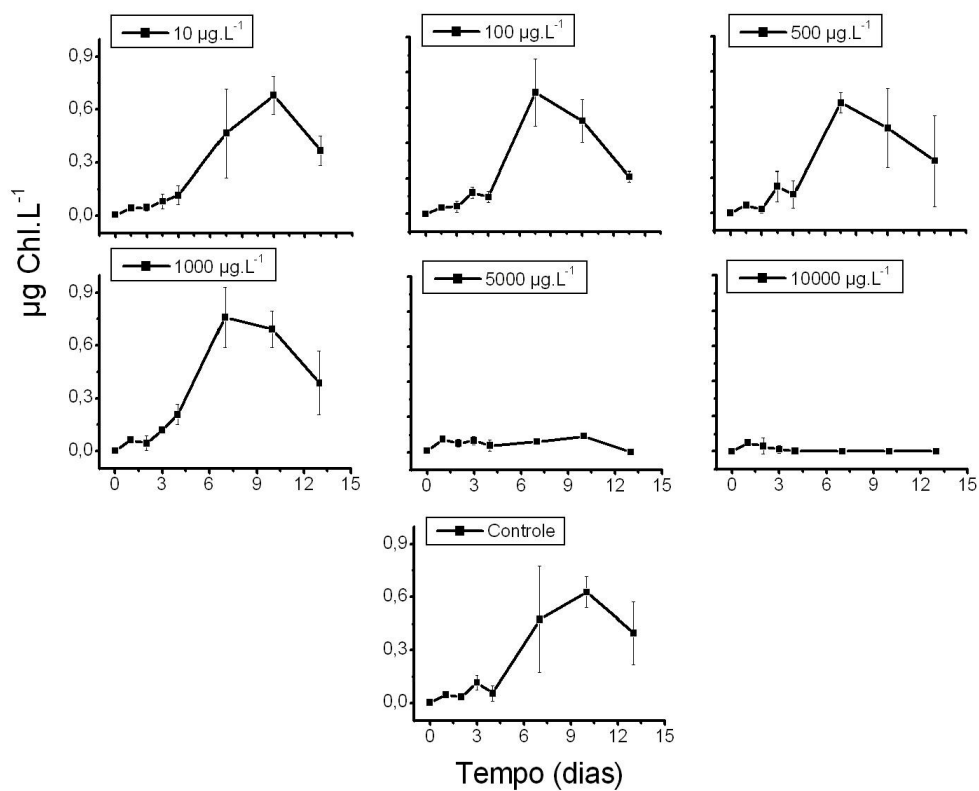


Figura 8: Concentração de clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de *Pediastrum boryanum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de tebuconazol e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão.

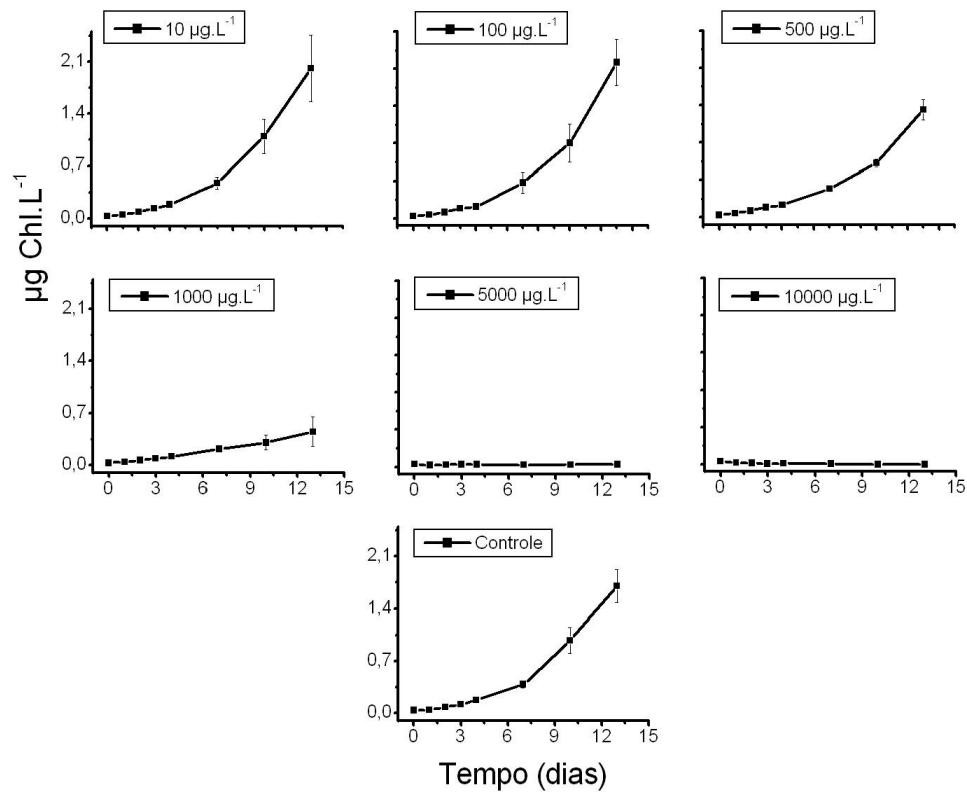


Figura 9: Concentração de clorofila-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em seis diferentes concentrações de tebuconazol e um controle sem adição do composto. As barras de erro representam o desvio padrão.

A Tabela 1 mostra respectivamente a taxa intrínseca de crescimento (R), taxa de crescimento convertida para duplicações por dia (k) e o tempo para biomassa ser duplicada (G), calculadas para a densidade celular. A taxa intrínseca de crescimento e a taxa de crescimento convertida para duplicações por dia foram maiores nas culturas com *Spondylosium pygmaeum*, *Pediastrum boryanum* e *Desmodesmus communis* respectivamente, enquanto o menor valor ocorreu em *Cosmarium depressum* var. *planctonicum*. Consequentemente o tempo para a biomassa ser duplicada foi maior em *C. depressum* var. *planctonicum* e menor em *D. communis*, *P. boryanum* e *S.*

pygmaeum. Houve diferença significativa para as taxas de crescimento, assim como para tempo de duplicação da biomassa, com exceção de *C. depressum* var. *planctonicum* que não apresentou tais diferenças. *D. communis* apresentou taxas de crescimento significativamente maiores na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e menores nas concentrações de 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto o tempo de duplicação da biomassa foi significativamente maior em 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e menor em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. *P. boryanum* apresentou taxas de crescimento significativamente maiores em 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e menores em 5.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, conseqüentemente o tempo para biomassa duplicar foi significativamente maior em 5.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e menor em 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em *S. pygmaeum* as taxas de crescimento foram significativamente maiores para o controle, 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e menores em 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, já o tempo de duplicação da biomassa foi maior em 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e menor para controle, 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 1: Taxa intrínseca de crescimento (R), taxa de crescimento convertida para duplicação por dia (K) e tempo para biomassa ser duplicada (G) das quatro cepas em seis diferentes concentrações de tebuconazol e um controle sem adição do composto. Os intervalos indicam o desvio padrão. As diferentes letras significam diferenças significativas nas taxas de crescimento (ANOVA “one-way”, *post-hoc* Tukey $p < 0,05$).

	R	K	G
<i>Cosmarium depressum var. planctonicum</i>			
10	^a 0,21±0,025	^a 0,3±0,035	^a 3,4±0,4
100	^a 0,18±0,011	^a 0,25±0,017	^a 3,9±0,29
500	^a 0,18±0,045	^a 0,26±0,065	^a 4,06±1,1
1000	^a 0,17±0,04	^a 0,25±0,056	^a 4,13±1,04
5000	^a 0,16±0,03	^a 0,23±0,04	^a 4,4±0,85
10000	0	0	0
Controle	^a 0,2±0,023	^a 0,29±0,035	^a 3,4±0,35
<i>Desmodesmus communis</i>			
10	^b 0,23±0,011	^b 0,34±0,017	^{cd} 2,96±0,11
100	^a 0,34±0,026	^a 0,49±0,036	^d 2,06±0,15
500	^b 0,21±0,01	^b 0,3±0,015	^{cd} 3,3±0,2
1000	^b 0,18±0,006	^b 0,26±0,006	^c 3,7±0,11
5000	^c 0,1±0,05	^c 0,14±0,075	^b 5,75±1,15
10000	^c 0,09±0,021	^c 0,12±0,032	^a 9,3±0,6
Controle	^b 0,21±0,021	^b 0,31±0,032	^{cd} 3,2±0,3
<i>Pediastrum boryanum</i>			
10	^a 0,27±0,015	^a 0,38±0,021	^c 2,63±0,15
100	^{ab} 0,23±0,021	^{ab} 0,33±0,03	^{bc} 3,1±0,25
500	^{ab} 0,25±0,026	^{ab} 0,36±0,036	^c 2,8±0,26
1000	^b 0,22±0,01	^b 0,32±0,015	^{bc} 3,1±0,15
5000	^c 0,033±0,011	^c 0,05±0,017	^a 17,3±0
10000	0	0	0
Controle	^b 0,21±0	^b 0,3±0	^b 3,3±0
<i>Spondylosium pygmaeum</i>			
10	^a 0,25±0	^{ab} 0,36±0	^c 2,8±0
100	^a 0,25±0	^{ab} 0,36±0	^c 2,8±0
500	^b 0,23±0,011	^b 0,34±0,017	^b 3±0,11
1000	^c 0,16±0	^c 0,23±0	^a 4,3±0
5000	0	0	0
10000	0	0	0
Controle	^a 0,26±0,006	^a 0,38±0,011	^c 2,7±0,06

A Tabela 2 mostra a inibição do crescimento na presença de tebuconazol após 96 horas (4 dias) e 13 dias para as quatro cepas testadas nas seis concentrações. Ocorreu

redução significativa na densidade celular de todas as cepas em relação ao controle. Após 4º dia a redução na densidade celular para *C. depressum* var. *planctonicum* foi observada nas concentrações 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, *D. communis* apresentou redução nas concentrações de 100, 1.000, 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto em *P. boryanum* e *S. pygmaeum* foi observada uma redução na densidade celular nas concentrações de 1.000, 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle. O 13º dia apresentou redução significativa em relação ao controle nas concentrações de 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *C. depressum* var. *planctonicum* e em todas as concentrações para *S. pygmaeum*. *Desmodesmus communis* e *P. boryanum* continuaram com redução nas mesmas concentrações apresentadas no 4º dia. (ANOVA “one-way”, Dunnett $p < 0,05$).

Tabela 2: Inibição do crescimento em comparação com o controle após 4 e 13 dias de exposição as seis concentrações de tebuconazol mostrada pela significância do teste Dunnett's (ANOVA “one-way”, *post-hoc* de Dunnett com $p < 0,05$).

Dias	10	100	500	1.000	5.000	10.000
<i>Cosmarium depressum</i> var. <i>planctonicum</i>						
04	0,97	0,65	0,91	0,97	<0,05	<0,05
13	0,11	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
<i>Desmodesmus communis</i>						
04	0,19	<0,05	0,64	<0,05	<0,05	<0,05
13	0,42	<0,05	0,15	<0,05	<0,05	<0,05
<i>Pediastrum boryanum</i>						
04	0,07	0,99	0,16	<0,05	<0,05	<0,05
13	0,99	0,17	0,87	<0,05	<0,05	<0,05
<i>Spondylosium pygmaeum</i>						
04	0,08	0,10	0,13	<0,05	<0,05	<0,05
13	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

A Tabela 3 mostra os valores do coeficiente de correlação, valor de significância da correlação e EC₅₀ obtidos a partir da regressão linear entre porcentagem de inibição e as concentrações utilizadas do tebuconazol, além dos valores obtidos para LOEC e NOEC. Foi observado que o tebuconazol apresentou valores de EC₅₀ no 4º dia semelhantes entre *D. communis*, *P. boryanum* e *S. pygmaeum*, já *C. depressum* var. *planctonicum* apresentou valor bem mais alto. LOEC e NOEC no 4º dia apresentaram valores iguais para três cepas, sendo que somente *C. depressum* var. *planctonicum* apresentou valores mais alto. Os valores de EC₅₀ no 13º dia foram semelhantes entre *C. depressum* var. *planctonicum*, *D. communis* e *P. boryanum*. *Spondylosium pygmaeum* apresentou o menor valor para EC₅₀ (1.851 µg L⁻¹). Para LOEC e NOEC *S. pygmaeum* também apresentou concentrações mais baixas, seguido de *C. depressum* var. *planctonicum*, *D. communis* e *P. boryanum*, sendo que os dois últimos apresentaram valores similares de LOEC e NOEC. Os resultados encontrados para a análise de sensibilidade seguiram o mesmo padrão do EC₅₀, *S. pygmaeum*, foi a cepa mais sensível. *Desmodesmus communis*, *P. boryanum* e *S. pygmaeum* apresentaram valores de sensibilidade muito semelhante em 4 dias de cultivo, já em 13 dias de cultivo a sensibilidade foi muito semelhante entre *C. depressum* var. *planctonicum*, *D. communis* e *P. boryanum*. *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* e *S. pygmaeum* apresentaram diferença significativa na sensibilidade entre os diferentes dias (Figura 10).

Tabela 3: Coeficiente de correlação (r) e valor de significância (p) obtido a partir da regressão linear entre porcentagem de inibição e as concentrações do tebuconazol, assim como EC₅₀ e valores LOEC e NOEC em µg L⁻¹ para *C. depressum* var. *planctonicum*, *D. communis*, *P. boryanum* e *S. pygmaeum*, em 4 e 13 dias de cultivo.

Dias	r	p	EC₅₀	LOEC	NOEC
<i>Cosmarium depressum</i> var. <i>planctonicum</i>					
4	0,89705	0,01535	12.006	5.000	1.000
13	0,98712	0,00025	3.616	100	10
<i>Desmodesmus communis</i>					
4	0,91525	0,01047	4.044	1.000	500
13	0,86638	0,02559	3.246	1.000	500
<i>Pediastrum boryanum</i>					
4	0,91612	0,01026	4.126	1.000	500
13	0,91853	0,00969	3.863	1.000	500
<i>Spondylosium pygmaeum</i>					
4	0,88893	0,01782	3.806	1.000	500
13	0,79338	0,05963	1.851	10	-

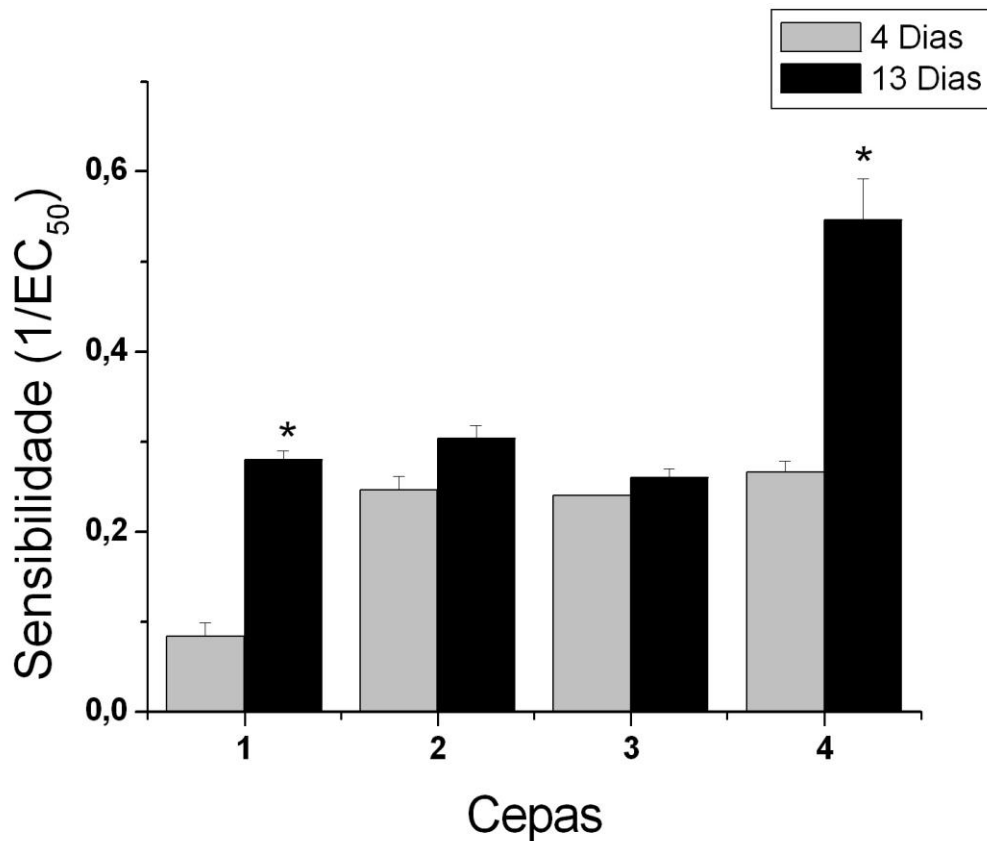


Figura 10: Sensibilidade de *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* (1), *Desmodesmus communis* (2), *Pediastrum boryanum* (3) e *Spondylosium pygmaeum* (4) ao tebuconazol. O asterisco (*) indica diferença significativa entre os dias 4 e 13 do experimento ($p < 0,05$). As barras de erro representam o desvio padrão.

4.5 Discussão

As comunidades de água doce estão experimentando mudanças rápidas na biodiversidade devido às influências humanas (Downing *et al.* 2008). O manejo inadequado de agrotóxicos nas lavouras pode resultar em contaminação das fontes de água (Gunningham e Sinclair 2005), pois uma vez no ambiente aquático, estas substâncias químicas têm o potencial de provocar efeitos adversos na saúde dos ecossistemas (Moore *et al.* 2007). Os agrotóxicos vem recebendo atenção por seu potencial para alterar a população e dinâmica da comunidade (Relyea e Hoverman

2006). As práticas agrícolas são a principal ameaça antropogênica à ecossistemas de água doce devido a fatores como a destruição do habitat, a sedimentação, eutrofização, e o escoamento de agrotóxicos (Downing *et al.* 2008). Segundo Ribeiro *et al.* (2007), em alguns casos, menos de 0,1% da quantidade de agrotóxicos aplicados alcançam o alvo, enquanto que o restante (99,9%) tem potencial para se mover para outros compartimentos ambientais, como águas superficiais e subterrâneas. Agrotóxicos utilizados na agricultura são regularmente detectados em ambientes aquáticos em todo o mundo (Gustafsson *et al.* 2010). Um dos grupos principais agrotóxicos, os fungicidas, constitui um grupo quimicamente muito diverso de compostos utilizados contra infecção fúngica em culturas, e é o grupo de pesticidas quantitativamente mais importante em algumas regiões do mundo (Castillo *et al.* 1997). O tebuconazol vem sendo registrado em sistemas aquáticos da região sul do Rio Grande do Sul (Cabrera *et al.* 2008; Demoliner *et al.* 2010), e os trabalhos realizados com este fungicida mostraram não apenas os efeitos tóxicos como CL_{50} (Zubrod *et al.* 2010) e concentração mínima inibitória (Woo *et al.* 2010), mas também efeitos fisiológicos do composto (Toni *et al.* 2011). No entanto, ainda são poucos os trabalhos realizados com este composto, principalmente em relação à comunidade fitoplanctônica, cujas primeiras informações a respeito da toxicidade do tebuconazol estão sendo fornecidas por este trabalho.

Este estudo mostrou que o tebuconazol apresentou toxicidade para as quatro espécies fitoplanctônicas nas concentrações 5.000 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, na concentração de 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentou toxicidade para *D. communis*, *P. boryanum* e *S. pygmaeum* e na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ somente para *S. pygmaeum*. Os resultados de clorofila-a para *C. depressum* var. *planctonicum* e *S. pygmaeum* apontaram o mesmo padrão de

crescimento encontrado em densidade celular, já *D. communis* e *P. boryanum* não apresentaram mesmo padrão de crescimento visto em densidade celular, possivelmente por um problema analítico. A toxicidade do tebuconazol em fungos é devido à inibição da síntese do ergosterol (Tebuco, Araçongas, PR, Brasil, 2010), que é o principal esterol da membrana plasmática da maioria dos fungos, já os mecanismos de toxicidade do tebuconazol para as microalgas são desconhecidos. Com exceção de *S. pygmaeum* que apresentou morte celular já no tempo 0 a partir da concentração de $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$, não se pode afirmar que nas outras cepas ocorreu morte celular ou foi uma inibição do crescimento nas concentrações em que houve diferença significativa em relação ao controle, desta forma, não pode-se concluir se o tebuconazol apresenta um efeito deletério ou inibitório para todas as cepas. Toxicidade semelhante a encontrada no presente trabalho foi encontrada por Hussar *et al.* (2004) que verificaram a concentração de $3.880 \mu\text{g L}^{-1}$ de tebuconazol causando 100% de mortalidade em alevinos e 80% em juvenis de *Piaractus mesopotamicus*, assim como a mortalidade de 40 % dos alevinos de *Tilapia rendalli*. Para *T. rendalli* a mortalidade de 100% ocorreu quando expostas a concentração de $7.750 \mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, Hatvani *et al.* (2006) relataram que linhagens dos fungos *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma atroviride*, apresentaram forte efeito inibitório quando expostos ao tebuconazol, com concentração mínima inibitória de $100 \mu\text{g/mL}$ em um período de crescimento de 3 a 5 dias.

A taxa intrínseca de crescimento e a taxa de crescimento convertida para duplicações por dia foram maiores nas culturas com *S. pygmaeum*, *P. boryanum*, *D. communis* e *C. depressum* var. *planctonicum* respectivamente. Este resultado está de acordo com os valores de densidade celular. Consequentemente o tempo para biomassa ser duplicada foi maior para *C. depressum* var. *planctonicum* seguido por *D. communis*,

P. boryanum e *S. pygmaeum*. O crescimento mais acelerado das espécies apresentando células menores já era esperado, pois segundo Sheldon (1984) a taxa de crescimento é inversamente proporcional ao tamanho das células. A influência que o tebuconazol apresentou nas taxas de crescimento apresentadas neste trabalho, nem sempre foram compreendidas, uma vez que *P. boryanum* e *D. communis* apresentaram maiores taxas de crescimento na concentração de 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, do que as taxas de crescimento apresentadas no controle. Dosnon-Olette *et al.* (2010) também encontraram influência na taxa de crescimento de algas expostas aos fungicidas dimethomorph e pyrimethanil, sendo estes compostos testados nas concentrações entre 200 e 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ e influenciando a taxa de crescimento de *Scenedesmus obliquus* (em todas as concentrações) e *Scenedesmus quadricauda* (apenas na concentração de 800 $\mu\text{g L}^{-1}$). Sancho *et al.* (2009) mostraram que o microcrustáceo *Daphnia magna* apresenta alteração no comportamento alimentar com redução na taxa de ingestão e filtração quando exposta ao tebuconazol nas concentrações de 410 e 710 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

Os valores de EC_{50} para *D. communis* e *P. boryanum* foram semelhantes tanto no 4° como no 13° dia, já *C. depressum* var. *planctonicum* apresentou valor semelhante de EC_{50} em relação as duas Chlorococcales no 13° dia, porém no 4° dia a EC_{50} foi muito alta. *Spondylosium pygmaeum* apresentou valores de EC_{50} mais baixo em relação as outras cepas tanto no 4° como no 13° dia e também apresentou uma diferença entre o 4° e o 13° dia. Estes resultados mostram que *S. pygmaeum* apresenta-se menos tolerante ao tebuconazol do que as outras cepas, e também mostra que as Desmidiáles apresentam um mecanismo de resistência a este poluente no início dos experimentos, pois ambas as cepas diminuíram a EC_{50} entre os dias 4 e 13, fato não observado nas cepas da Ordem Chlorococcales. Este mecanismo de resistência capaz de adiar os efeitos tóxicos do

tebuconazol pode estar relacionado à presença de uma cápsula mucilaginosa composta de polissacarídeos nestas cepas. Este processo de adsorção de compostos na cápsula mucilaginosa já foi mostrado por Lombardi *et al.* (2002) que comprovaram o sequestro de íons de cobre presentes no meio extracelular através da cápsula da microalga *Kirchneriella aperta*. Os valores de EC₅₀ encontrados por Ma *et al.* (2008) testadas com o fungicida propiconazol em 96 h (4 dias) para *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella pyrenoidosa* apresentaram valores de 1.340, 1.300, 3.580, 1.290 e 1.340 µg L⁻¹ respectivamente, sendo estes, próximos aos valores de EC₅₀ encontrados no 13° dia do presente estudo.

A sensibilidade das cepas ao tebuconazol foi maior em *S. pygmaeum* no 13° dia, enquanto no 4° dia a sensibilidade foi muito semelhante aos valores encontrado para *D. communis* e *P. boryanum*, sendo que *D. communis* apresentou um aumento na sensibilidade, já *P. boryanum* manteve o valor de sensibilidade até o final do experimento. *C. depressum* var. *planctonicum* apresentou valor de sensibilidade no 13° dia muito semelhante a *D. communis* e *P. boryanum*, porém com valores de sensibilidade mais baixos no 4° dia. Estudos anteriores realizados com organismos da Ordem Desmidiata identificam estes organismos como excelentes bioindicadores de ambientes oligotróficos, devido a sua baixa tolerância a contaminação (Coesel 2001; Spijkerman *et al.* 2004; Ngearnpat e Peerapornpisal 2007). Por outro lado, a Ordem Chlorococcales é frequentemente encontrada em ambientes eutrofizados (Debenay *et al.* 2003). Os resultados encontrados neste trabalho identificaram maior sensibilidade ao tebuconazol pela desmídia *S. pygmaeum* no 13° dia, no entanto no 4° dia a sensibilidade é semelhante a das Chlorococcales. *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* também

apresenta um aumento na sensibilidade com o passar do tempo, embora apresente-se mais tolerante do que *S. pygmaeum*. A tolerância apresentada pelas Desmidiáles nos dados obtidos por este estudo, principalmente para *C. depressum* var. *planctonicum* pode estar relacionada com a presença de uma espessa cápsula composta por polissacarídeos complexos excretados pelas cepas, representando 46 e 12,5% do diâmetro de *Cosmarium depressum* var. *planctonicum* e *Spondylosium pygmaeum*, respectivamente.

Os valores de LOEC e NOEC foram iguais entre o 4º e o 13º dia para *D. communis* e *P. boryanum*, já para *C. depressum* var. *plactonicum* e *S. pygmaeum* apresentaram-se diferentes entre os dias, diminuindo os valores com o passar do tempo, do mesmo modo que o EC₅₀. Ma *et al.* (2008) encontraram valores de LOEC e NOEC em 96 h para cinco algas verdes testando o fungicida propiconazol, porém os valores encontrados somente podem ser comparados com nossos resultados obtidos para *C. depressum* var. *planctonicum* e *S. pygmaeum* (análise realizada no 13º dia). DeLorenzo e Serrano (2003) encontraram valor de LOEC de 100 µg L⁻¹ (96 h) para a alga *Dunaliella tertiolecta* em relação ao fungicida chlorothalonil, resultado que foi encontrado em nosso estudo para *C. depressum* var. *planctonicum* porém com 13 dias de cultivo.

Segundo Relyea e Dieks (2008) os efeitos de contaminantes na comunidade dependem de muitos fatores, incluindo a concentração do contaminante, o momento da exposição e o número de exposições. Eles observaram que um tratamento consistindo de sete semanas com aplicação de 10 µg L⁻¹ de malathion causa impactos maiores em muitas variáveis, do que uma única aplicação, mesmo a concentração sendo 25 vezes maior. Portanto, fica clara a necessidade de estudos futuros para aprofundar o

conhecimento da toxicidade do tebuconazol sobre a comunidade fitoplanctônica que é base da cadeia alimentar aquática e desempenha fundamental importância para o equilíbrio do ambiente aquático.

4.6 Conclusões

Pode-se concluir que o tebuconazol apresentou toxicidade para as quatro microalgas, sendo que *S. pygmaeum*, *D. communis*, *P. boryanum* e *C. depressum* var. *planctonicum* apresentaram toxicidade a partir de 500, 1.000, 1.000 e 5.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Este é o primeiro trabalho a fornecer informações importantes da toxicidade do fungicida tebuconazol sobre a comunidade fitoplanctônica, identificando uma toxicidade alta em comparação a outros pesticidas, servindo portanto, como subsídio para a revisão da legislação ambiental brasileira sobre os parâmetros aceitáveis ou compostos permitidos para a aplicação como agrotóxicos.

4.7 Referências Bibliográficas

- ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: Monografia dos Agrotóxicos. Tebuconazol. Resolução 160 de 19 de janeiro de 2010. **Diário Oficial da União, Brasília, DF. Publicado no DOU de 20 de janeiro de 2010.**
- Cabrera, L., Costa, F. P. e Primel, E. G. 2008. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado RS. **Química Nova, 31:1982-1986.**
- Caldas, E. D. e Souza, L. C. K. 2000. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticida na dieta brasileira. **Saúde Pública, 34:529-537.**
- Calza, P., Baudino, S., Aigotti, R., Baiocchi, C., Branca, P. e Pelizzetti, E. 2002. High-performance liquid chromatographic/tandem mass spectrometric identification of the phototransformation products of tebuconazole on titanium dioxide. **Journal of Mass Spectrometry, 37:566-576.**
- Castillo, L. E., De La Cruz, E. e Ruepert, C. 1997. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of central america. **Environmental Toxicology and Chemistry, 16:41-51.**
- Coesel, P. F. M. 2001. A method for quantifying conservation value in lentic freshwater habitats using desmids as indicator organisms. **Biodiversity and Conservation 10: 177-187.**
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, resolução n° 357, de 17 de março de 2005.
- Debenay, J. P., Carbonel, P., Morzadec-Kerfourn, M.-T., Cazaubon, A., Deneffe, M. e Lezine, A.-M. 2003. Multi-bioindicator study of a small estuary in Vendée (France). **Estuarine, Coastal and Shelf Science 58:843–860.**
- DeLorenzo, M. E. e Serrano, L. 2003. Individual and mixture toxicity of three pesticides; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Danaliella tertiolecta*. **Journal of Environmental Science and Health. B 38:529-538.**

- Demoliner, A., Caldas, S. S., Costa, F. P., Gonçalves, F. F., Clementin, R. M., Milani, M. R. e Primel, E. G. 2010. Development and validation of a method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the determination of multiple classes of pesticides and metabolites in water samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society** **21: 1424-1433**.
- Deng, L., Senseman, S. A., Gentry, T. J., Zuberer, D. A., Weiss, T. L., Devarenne, T. P. e Camargo, E. R. 2012. Effect of selected herbicides on growth and hydrocarbon content of *Botryococcus braunii* (Race B). **Industrial Crops and Products**, **39:154-161**.
- Dosnon-Olette, R., Trotel-Aziz, P., Couderchet, M. e Eullaffroy, P. 2010. Fungicides and herbicide removal in *Scenedesmus* cell suspensions. **Chemosphere**, **79:117-123**.
- Downing, A. L., DeVanna, K. M., Rubeck-Schurtz, C. N., Tuhela, L. e Grunkemeyer, H. 2008. Community and ecosystem responses to a pulsed pesticide disturbance in freshwater ecosystems. **Ecotoxicology** **17:539-548**.
- Fogg, G. E. 1975: *Algae Cultures and Phytoplankton Ecology*, Wisconsin, USA.
- Guillard, R. R. L. e Lorenzen, C. J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. **Journal of Phycology**, **8:10-14**.
- Gunningham, N. e Sinclair, D. 2005. Policy instrument choice and diffuse source pollution. **Journal of Environmental Law** **17:51-81**.
- Gustafsson, K., Blidberg, E., Elfgren, I. K., Hellstrom, A., Kylin, H. e Gorokhova, E. 2010. Direct and indirect effects of the fungicide azoxystrobin in outdoor brackish water microcosms. **Ecotoxicology**, **19:431-444**.
- Hatvani, L., Manczinger, L., Kredics, L., Szekeres, A., Antal, Z. e Vágvölgyi, C. 2006. Production of *Trichoderma* strains with pesticide-polyresistance by mutagenesis and protoplast fusion. **Antonie van Leeuwenhoek** **89:387-393**.
- Hussar, G. J., Paradela, A. L., Jonas, T. C., Serra, W., Gomes, J. P. R. e Peres, M. R. 2004. Ensaio para a determinação de dosagem tóxica do fungicida tebuconazole

- (FOLICUR 200 CE) sobre alevinos e juvenis de Tilápia (*Tilapia rendalli*) e de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Engenharia Ambiental** **1:35-44**.
- Lombardi, A. T., Vieira, A. A. H. e Sartori, L. A. 2002. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology** **38:332-337**.
- Ma, J., Chen, J., Wang, P. e Tong, S. 2008. Comparative sensitivity of eight freshwater phytoplankton species to isoprocarb, propargite, flumetralin and propiconazol. **Polish Journal of Environmental Studies** **17:525 – 529**.
- Ma, J. e Liang, W. 2001. Acute toxicity of 12 herbicides to the green alga *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** **67:347-351**.
- Ma, J., Lu, N., Qin, W., Xu, R., Wang, Y. e Chen, X. 2006. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **63:268-274**.
- Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. **Journal of Biological Chemistry**, **140:315-322**.
- Moore, M. T., Cooper, C. M., Smith Jr., S., Cullum, R. F., Knight, S. S., Locke, M. A. e Bennett, E. R. 2007. Diazinon mitigation in constructed wetlands: influence of vegetation. **Water Air Soil Pollut.** **184:313-321**.
- Ngearnpat, N. e Peerapornpisal, Y. 2007. Application of desmid diversity in assessing the water quality of 12 freshwater resources in Thailand. **Journal Applied Phycology** **19:667-674**.
- Relyea, R. A. e Dieks, N. 2008. Na unforeseen chain of events for amphibians: lethal effects of pesticides at sublethal concentrations. **Ecological Application** **18:1728-1742**.
- Relyea, R. A. e Hoverman, J. 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. **Ecology Letters** **9:1157-1171**.

- Ribeiro, M. L., Lourencetti, C., Pereira, S. Y. e Marchi, M. R. R. 2007. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, **30:688-694**.
- Saker, M. L. e Neilan, B. A. 2001. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from northern Australia. **Applied and Environmental Microbiology** **67:1839-1845**.
- Sanches, S. M., Silva, C. H. T. P., Campos, S. X. e Vieira, E. M. 2003. Pesticidas e seus respectivos riscos associados a contaminação da água. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente** **13:53-58**.
- Sancho, E., Villarroel, M. J., Andreu, E. e Ferrando, M. D. 2009. Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. **Chemosphere** **74:1171-1179**.
- Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A. e Sibley, C. M. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. **Clinical Microbiology Reviews** **12:40-79**.
- Sheldon, R. W. 1984. Phytoplankton growth rates in tropical ocean. **Limnology and Oceanography** **29:1342-1346**.
- Spijkerman, E., Garcia-Mendoza, E., Matthijs, H. C. P., Van Hunnik, E. e Coesel, P. F. M. 2004. Negative effects of P-buffering and pH on photosynthetic activity of planktonic desmid species. **Photosynthetica** **42:49-57**.
- Tebuco. Concentração Emulsionável. Arapongas, PR. NORTOX. 2010. Bula.
- Toni, C., Loro, V. L., Santi, A., Menezes, C. C., Cattaneo, R., Clasen, B. E. e Zanella, R. 2011. Exposure to tebuconazol in Rice Field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, **153:128-132**.
- Verdisson, S., Couderchet, M. e Vernet, G. 2001. Effects of procymidone, fludioxonil and pyrimethanil on two non-target aquatic plants. **Chemosphere** **44:467-474**.

Woo, C., Daniels, B., Stirling, R. e Morris, P. 2010. Tebuconazole and propiconazole tolerance and possible degradation by Basidiomycetes: A wood-based bioassay. **International Biodeterioration e Biodegradation**, **64:403-408**.

Zubrod, J. P., Bundschuh, M. e Schulz, R. 2010. Effects of subchronic fungicide exposure on the energy processing of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **73:1674–1680**.

4.8 Anexos

Anexo 1

Meio WC pH 7,0 (Guillard e Lorenzen, 1972)

1. CaCl₂	36,8 g/L	1 mL/L
2. MgSo₄	37,0 g/L	1 mL/L
3. NaHCO₃	12,6 g/L	1 mL/L
4. K₂HPO₄	8,7 g/L	1 mL/L
5. NaNO₃	85 g/L	1 mL/L
6. Na₂SiO₃	28,4 g/L	1 mL/L
7. Micronutrientes		1 mL/L
Na ₂ EDTA	4,36 g/L	
FeCl ₃	3,15 g/L	
CuSO ₄	0,010 g/L	
ZnSO ₄	0,022 g/L	
CoCl ₂	0,010 g/L	
MnCl ₂	0,018 g/L	
Na ₂ MoO ₄	0,0006 g/L	
H ₃ BO ₃	0,1 g/L	
8. Vitaminas		1 mL/L
Tiamina	0,1 g/L	
Biotina	0,0005 g/L	
B12	0,0005 g/L	

No WC/2 todos os elementos são reduzidos pela metade.

Anexo 2

Concentrações de Tebucó Nortox utilizadas em lavouras, conforme estabelecido pelo fornecedor.

Cultura	Pragas	Dose - Litro/ha
Algodão	Ferrugem-do-algodoeiro	0,75 - 1
Alho	Ferrugem	1
Aveia	Ferrugem-da-folha	0,60 - 0,75
Batata	Pinta-preta	1
Café	Ferrugem-do-cafeeiro	1
Cebola	Mancha-púrpura	1
Cevada	Mancha-marrom	0,75
Feijão	Mancha-angular	1
Soja	Mancha-parda	0,75
Trigo	Ferrugem-da-folha	0,60 - 0,75
Tomate	Pinta-preta	1

Um litro do produto contém 200 gramas de tebuconazol.

ha - hectare

