



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

Avaliação de Risco Ambiental de Pesticidas para Ecossistemas Aquáticos – Representatividade das Espécies Padrão de Invertebrados

Liliana Raquel Assunção dos Santos

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente – Gestão Ambiental

Orientador: Investigador Doutor Michiel Adriaan Daam

Coorientadora: Professora Doutora Maria José Antão Pais de Almeida Cerejeira

Júri:

Presidente - Doutora Amarilis Paula Alberti de Varennes e Mendonça, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais - Doutora Elizabeth da Costa Neves Fernandes de Almeida Duarte, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Maria José Antão Pais de Almeida Cerejeira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor Michiel Adriaan Daam, Investigador Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

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

Lisboa, 2012

Agradecimentos

Ao meu Orientador, Dr. Michiel Daam, por todo o apoio e confiança que depositou em mim ao longo destes últimos meses, pela sua paciência e pronta disponibilidade em esclarecer todas as minhas dúvidas, a sua ajuda foi fundamental.

À minha coorientadora, Dra. Maria José Cerejeira, pela ajuda e apoio durante estes meses.

Aos meus pais que, embora de maneiras diferentes sempre lá estiveram para me apoiar. Mãe obrigada por todo o sacrifício, amor e enorme paciência.

À minha irmã pelas nossas aventuras, por me chateares e principalmente, por estares sempre presente.

Aos meus avós, obrigada por tudo. Vocês são sem dúvida, duas das pessoas mais importantes na minha vida.

Aos meus amigos por estarem sempre lá para ajudar, animar, implicar, simplesmente por estarem, foram os melhores amigos que poderia desejar em todo este percurso. Aos de sempre, aos mais recentes, todos ocupam um lugar importante na minha vida, mas não posso deixar de destacar duas pessoas: Patrícia, obrigada por estares presente em todos os momentos, pela paciência e principalmente, pela amizade; Joana, durante estes cinco anos foste a minha grande companheira, obrigada por todo o carinho e pelas nossas quartas-feiras que foram fundamentais para me distrair e divertir.

Resumo

Com o objetivo de verificar se a *Daphnia magna* é suficiente para a avaliação de risco ambiental dos pesticidas, em ecossistemas aquáticos, foram analisados dados de toxicidade de 218 inseticidas. Para cada um foi calculado o valor da tolerância relativa (Trel), para comparar a sensibilidade das espécies, a partir dos diferentes grupos taxonômicos, com a *Daphnia*. Os grupos taxonômicos foram agrupados em artrópodes, invertebrados não artrópodes, peixes e algas/macrófitas e, a partir dos valores da Trel elaboradas as curvas de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD), para os artrópodes foram analisados os modos de ação (MOA). Ainda, nos artrópodes foram identificadas para cada espécie, a classe, ordem e família a que pertencem. Para verificar a necessidade de inclusão de uma segunda espécie além da *Daphnia* na avaliação de risco aquático foram realizados estudos, entre a *D. magna*, *Americamysis bahia* e o *Chironomus riparius*. Com base nos resultados obtidos para as curvas SSD foram os artrópodes que se revelaram os mais sensíveis tanto nos valores de EC₅₀ como nos de NOEC. Quanto aos MOA foi o grupo dos neonicotinóides o mais sensível, no caso do EC₅₀ e o GABA – *gated chloride channel antagonists* com base no NOEC. O grupo taxonômico mais sensível foi o grupo *Mysida* e foi a combinação *Daphnia* e *A. bahia* que deu maior percentagem de proteção.

Palavras-chave: Avaliação de risco ambiental; invertebrados aquáticos; inseticidas; ecossistema aquático; modo de ação; distribuição da sensibilidade das espécies.

Abstract

With the main aim of verifying whether *Daphnia magna* is sufficient for the evaluation of the environmental risk of pesticides to aquatic ecosystems, toxicity values of 218 insecticides were analyzed. For each one the relative tolerance (Trel) value was calculated to compare the sensitivity of species from different taxonomic groups with that of *D. magna*. The taxonomic groups were grouped in arthropods, non-arthropod invertebrates, fish, algae/macrophytes and based on Trel values the species sensitivity distribution (SSD) were defined. For the arthropods the influence of the mode of action (MOA) on vulnerability to the insecticide was also analyzed. Still in the arthropods group, for each species, the class, order and family they belong to were identified. To check the necessity of inclusion of a second species studies of relationship were performed, between *D. magna*, *Americamysis bahia* and *Chironomus riparius*. As far as the SSD curves are concerned, for the different groups the most sensitive one was the arthropods group in both values of EC₅₀ and NOEC. Taking into consideration MOA the group of neonicotinoids was the most sensitive one in EC₅₀ case and the GABA – gated chloride channel antagonists in NOEC. The most sensitive taxonomical group was *Mysida* and it was the combination of *Daphnia* plus *A. Bahia* that generated the greater percentage of protection.

Keywords: Environmental Risk Assessment, Aquatic invertebrates, Insecticides, Aquatic ecosystem, Mode of action, Species sensitivity distributions

Extended Abstract

In the 20th century, the use of pesticides was intensified to increase productivity of yields. Since irrigation canals surrounding agricultural fields may become contaminated with pesticide residues via spray drift, drainage, run-off and/or accidental spills, undesirable side-effects on aquatic organisms may ensue. To protect sensitive freshwater ecosystems from pesticide stress, jurisdictions of many countries have set water quality criteria and started to require a prospective Environmental Risk Assessment (ERA) before registration of a pesticide. In Europe, for example, procedures for prospective testing of pesticides to evaluate the environmental risks of pesticides before their placing on the market are described in the EU Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology (SANCO, 2002). On the other hand, the Water Framework Directive (2000/60/EC; EU 2000) aims to achieve “good status” for European surface waters, which will be achieved, in part, by protecting the populations of water organisms from chemical stress (Daam and Van den Brink, 2011).

Ecotoxicological assessments shall take into account the scientific developments and should include all available biological data and information which is relevant to the assessment of the ecotoxicological profile of the active substance shall be reported. There is also a need to report all potentially adverse effects found during routine ecotoxicological investigations, such additional studies which may be necessary to investigate the probable mechanisms involved and assess the significance of these effects (SANCO, 2010).

Over the past decades, a wide array of aquatic toxicity test approaches have been developed and applied to determine side effects posed by chemicals like pesticides on freshwater community structure and functioning. These tests range from relatively simple laboratory bioassays to large complex field studies. Evaluating the fate and effects under field conditions may be considered ideal for an ecological realism point of view. On the other hand, such studies are rather costly and the higher level of complexity makes that causal-effect relationships are more difficult to establish (Daam and Van den Brink, 2011).

The objective of this work was to verify whether *Daphnia magna* is enough for the evaluation of the environmental risk of pesticides in aquatic ecosystems, or if there is the necessity of including more standard species to assure that all species are protected. The evaluation of this necessity of inclusion of more species has been made according to the new Plant Protection Product Regulation (EC, 2009), incising on the changes that will appear on the aquatic invertebrates. In this work will be used bioassays data and not ecosystem models, like the ones used by Brock and Wijngaarden (2012). The advantage of using bioassays is related to the large amount of data available for different species. Thus, for

example, the absence of information about a given species in ecosystem models may lead to the conclusion that this species is protected, and when the analysis is based on bioassays data (where there is more information available), this species cannot be protected.

The following conclusions could be drawn from the present study: for both acute (EC_{50}) and for chronic (NOEC) values arthropods was the most sensitive taxonomic group. These results were expected since only insecticides/acaricides were studied. In the arthropods group, for EC_{50} values, the neonicotinoids was the most sensitive MOA as compared to *D. magna*. With regard to the taxonomical orders of the acute toxicity, the order *Mysida* (order where *A. bahia* belongs to) was the one that presents a greater sensitivity relative to *D. magna*. This result is very important, because according to the new data requirements of the EU on the evaluation of the aquatic effect of insecticides, *A. bahia* is one of the species that has been suggested to be included as an additional test to *D. magna* in the acute toxicity tests (SANCO, 2010).

In studies of interrelation that were made to verify the necessity of including a second aquatic arthropod, we verified that the combination of *D. magna* and *A. bahia* was the case where we can verify a larger number of protected species. However, the most interesting aspect was to verify that *A. bahia* by itself had a higher percentage of protection, when compared to sole testing of *D. magna*. Despite this, observing that the total number of data was superior in the case of *D. magna* comparing to *A. bahia*, this fact can lead us to the idea that the percentage of protection of *A. bahia* is superior to the percentage of protection of *D. magna*, due to the lack of data. The *D. magna* is representative for most insecticides however, for some specific modes of action such as neonicotinoids, this species may not be a good indicator. The *A. bahia* can be a good species for the study of neonicotinoids sensitivity, since it protected most arthropods (PAF = 1,3%). Further research is needed to confirm this for a greater number of compounds, especially for those where *D. magna* seems to be less protective.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Extended Abstract	iv
Lista de figuras.....	vii
Lista de Acrónimos e Siglas	viii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Avaliação prospetiva de risco dos pesticidas	3
2.2 Distribuição da Sensibilidade das Espécies (SSD)	5
2.3 Procedimento de Avaliação de Risco Prospetivo – 1º nível - baseado no atual Documento de Orientação sobre Ecotoxicologia Aquática	7
2.4 Procedimento de Avaliação de Risco Prospetivo baseado no novo Regulamento de Proteção dos Produtos Fitofarmacêuticos	11
2.5 Sensibilidade de invertebrados em relação à <i>Daphnia magna</i>	14
3. Materiais e Métodos. Resultados e Discussão	19
4. Conclusões.....	43
Referências Bibliográficas	45

Lista de figuras

- Figura 1** – Diferentes níveis de testes ecotoxicológicos e suas vantagens e desvantagens (adaptado de Brock et al., 2000)..... 2
- Figura 2** - Esquema da abordagem por níveis para a avaliação do efeito dos pesticidas (adaptado de Brock e Van Wijngaarden, 2012)..... 5
- Figura 3** - Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD): cálculo das concentrações de risco (HC_5 e HC_{50}) para definição de normas de qualidade ambiental; cálculo da fração potencialmente afetada (PAF) a partir de uma concentração ambiental de pesticidas 6
- Figura 4** - Esquema do procedimento de avaliação de risco – 1º nível (adaptado do Documento de Orientação da UE sobre Ecotoxicologia aquática (SANCO, 2002))..... 10
- Figura 5** – Gráfico de comparação da $NOEC_{eco}$ com as RAC para os artrópodes de primeiro nível, com base em dados de toxicidade aguda (Ab/100). A linha representa a proporção de 1:1 ($RAC/NOEC_{eco}$) (Adaptado de Brock e Wijngaarden, 2012)..... 17

Lista de Acrónimos e Siglas

- BCF – “Bioconcentration factor”; Fator de Bioconcentração
- DT₁₀ – “Degradation time 10%”; Tempo de degradação de 10%
- DT₅₀ – “Degradation time 50%”; Tempo de degradação médio
- 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
- 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
- MOA – “Mode of action”; Modo de ação
- NOEC – “No observed effect concentration”; Concentração sem efeitos observáveis
- NOEC_{eco} – “No observed effect concentration ecosystem”; Concentração sem efeitos observáveis no ecossistema
- PAF – “Potentially affected fraction”; 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
- UF – “Uncertainty factor”; Fator de incerteza

1. Introdução

No século XX, houve uma intensificação na utilização de pesticidas com o objetivo de aumentar a produtividade agrícola. As águas superficiais na proximidade dos campos agrícolas podem ficar contaminadas com resíduos de pesticidas através do transporte aéreo (*spray-drift*), ou por drenagem e escoamento, o que pode provocar efeitos indesejáveis nos organismos aquáticos. Com o objetivo de proteger os ecossistemas de água doce dos pesticidas, as jurisdições de muitos países estabeleceram critérios de qualidade da água e começaram a exigir uma avaliação de risco ambiental (ERA) antes do registo do pesticida. Por exemplo, na Europa, os possíveis testes a pesticidas para avaliar os seus riscos ambientais antes da sua colocação no mercado estão descritos no documento de orientação da UE sobre Ecotoxicologia Aquática (SANCO, 2002). Neste momento, o documento SANCO 2002 está a ser reavaliado (SANCO, 2010), um documento de apoio ao Regulamento nº 1107/2009 (EC, 2009). Por outro lado, a Diretiva Quadro da Água (2000/60/CE; EC 2000) pretende que se atinja o “bom estado” das águas europeias, que será alcançado, em parte, protegendo as populações de organismos aquáticos da influência das substâncias químicas (Daam e Van den Brink, 2011).

Na avaliação ecotoxicológica deve ter-se em conta a evolução científica, bem como todos os dados biológicos e informações disponíveis relevantes para a avaliação do perfil ecotoxicológico da substância ativa. Deve-se, também, verificar 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).

Nas últimas décadas, uma grande variedade de testes de toxicidade aquática tem sido desenvolvida e utilizada para determinar os efeitos colaterais provocados por produtos químicos, como pesticidas, na estrutura e no funcionamento dos ecossistemas de água doce. Estes testes podem ir desde bioensaios de laboratório relativamente simples, a estudos de campo mais complexos (Figura 1) (Daam e Van den Brink, 2011). Nos bioensaios de laboratório, a toxicidade dos pesticidas é avaliada apenas com uma espécie de ensaio (*single species tests*). São testes bastante precisos e com uma taxa de desempenho também elevada. Por outro lado, o uso destes testes é frequentemente contestado devido ao número limitado de espécies testadas e à falta de realismo ecológico. Outros testes utilizados para avaliar a toxicidade dos pesticidas são os modelos de ecossistema (microcosmos e mesocosmos). Os modelos de ecossistema têm sido considerados como uma ponte entre os bioensaios e os ensaios de campo, na medida em que permitem a replicação, são facilmente controláveis e fornecem realismo ecológico. A

diferença entre microcosmos e mesocosmos é o seu tamanho e, portanto, muitas vezes a sua complexidade (Daam e Van den Brink, 2011). Segundo a definição de Crossland et al. (1992), microcosmos são sistemas experimentais com um volume de água inferior a 15 m³ ou canais experimentais com menos de 15 m de comprimento, enquanto mesocosmos são definidos como sistemas experimentais que contenham mais de 15 m³ de água ou canais experimentais maiores do que 15 m. Ao avaliar o destino e os efeitos dos pesticidas nas condições de campo, pode-se ter uma noção do realismo ecológico. Por outro lado, tais estudos são bastante dispendiosos e quanto maior o nível de complexidade, mais difícil é estabelecer as relações causa-efeito (Daam e Van den Brink, 2011; Figura 1).

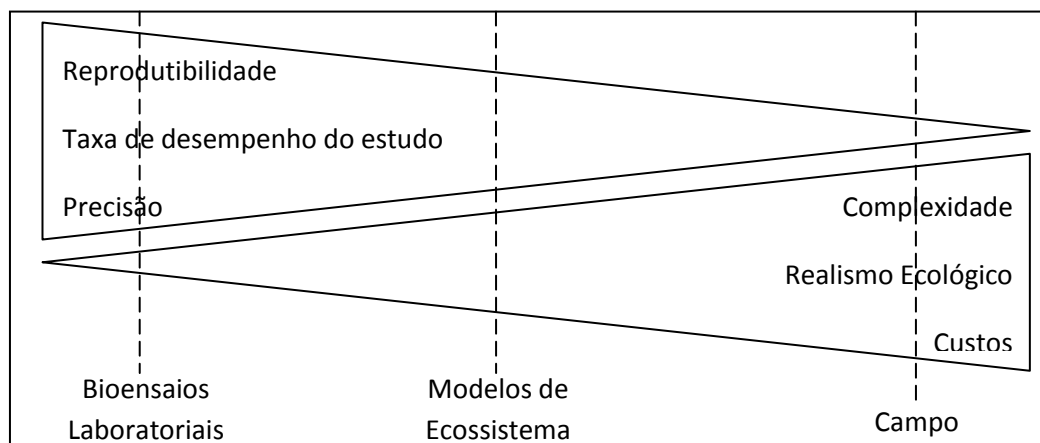


Figura 1 – Diferentes níveis de testes ecotoxicológicos e suas vantagens e desvantagens (adaptado de Brock et al., 2000)

Tem-se vindo a discutir se a utilização somente da *Daphnia magna* será suficiente para a avaliação de risco ambiental de pesticidas em ecossistemas aquáticos, de modo a garantir a proteção de todas as espécies. No novo documento SANCO vai ser pedido um ensaio adicional, com a espécie Mysid shrimp (*Americamysis bahia*) ou o *Chironomus sp.* (SANCO, 2010). Como ainda não está claro qual a espécie que deverá ser adicionada, o objetivo deste trabalho foi avaliar a necessidade de inclusão de mais espécies, com base no novo Regulamento de Proteção dos Produtos Fitofarmacêuticos (EC, 2009), incidindo nas alterações que irão surgir nos invertebrados aquáticos.

O presente estudo está organizado em quatro capítulos, onde no capítulo dois é feita uma breve revisão sobre a avaliação prospetiva de risco dos pesticidas, pormenorizando a distribuição da sensibilidade das espécies. Avalia-se as principais diferenças que irão surgir no procedimento de avaliação de risco, baseado no atual e no novo relatório da UE e, por fim, apresentam-se três estudos realizados sobre a sensibilidade dos invertebrados em relação à *D. magna*. No capítulo três apresentam-se os materiais e métodos, bem como os resultados e sua discussão, em formato de artigo, conforme autorização da Comissão de Curso de Engenharia do Ambiente. Por fim, no capítulo quatro são descritas as principais conclusões obtidas com a realização deste estudo.

2. Revisão Bibliográfica

Para a proteção dos ecossistemas aquáticos foi elaborada a Diretiva Quadro da Água (2000/60/CE; EC 2000), que tem como principal objetivo alcançar um “bom estado” ecológico e químico das águas, na Europa, até 2015. Esta diretiva exige uma avaliação retrospectiva (de diagnóstico), isto é, ter em conta os efeitos conhecidos ou medidos, bem como os dados de exposição e considerar o risco existente ou passado, bem como as descargas para o ambiente (Solomon et al., 2008). Assim sendo, tem como alguns dos seus objetivos:

- Prevenir a deterioração, proteger e melhorar o estado dos ecossistemas aquáticos, e também dos ecossistemas terrestres e zonas húmidas diretamente dependentes dos ecossistemas aquáticos, no que respeita às suas necessidades em água;
- Promover a utilização sustentável das águas com base na proteção a longo prazo dos recursos hídricos disponíveis;
- Visar o reforço da proteção e a melhoria do ambiente aquático, em particular através de medidas para a redução progressiva e eliminação das descargas, emissões e perdas de substâncias prioritárias e substâncias prioritárias perigosas respetivamente;
- Assegurar a redução progressiva da poluição das águas subterrâneas;
- Contribuir para mitigar os efeitos das inundações e secas.

De forma a contribuir para:

- O fornecimento de água em quantidade e qualidade suficiente para uma utilização sustentável, equilibrada e equitativa do recurso;
- A redução significativa da poluição das águas subterrâneas;
- A proteção das águas marinhas e territoriais.

Além desta abordagem retrospectiva, também é feita uma avaliação prospetiva (de prognóstico), ou seja, é realizada antes da comercialização ou utilização de substâncias no ambiente e requer maior utilização de modelos para estimar a exposição (Solomon et al., 2008).

2.1 Avaliação prospetiva de risco dos pesticidas

O processo de definição de critérios por níveis na ERA tem sido frequentemente recomendado para a avaliação de risco de pesticidas (ex. Solomon et al., 2008). O conceito desta abordagem por níveis é começar com uma avaliação simples e nos níveis superiores fazer uma avaliação mais complexa. O primeiro nível de avaliação permite que as substâncias que não apresentem risco, a partir de uma avaliação precoce, sejam aceites permitindo, assim, uma abordagem mais pormenorizada para as substâncias mais

problemáticas. Nos níveis superiores as estimativas de exposição e/ou efeito são cada vez mais realistas. A ERA na UE é baseada na relação entre a toxicidade (RAC – concentração legislativa aceitável) e a exposição (PEC: concentração prevista no ambiente). A RAC é baseada em valores de toxicidade de bioensaios laboratoriais, com um número limitado de espécies padrão (normalmente a *Daphnia*, uma alga e um peixe – explicado mais à frente). O cálculo da PEC utiliza características dos pesticidas, a dose recomendada de pesticidas e um cenário padrão simulado como parâmetros de entrada, através de modelos computacionais como o utilizado pelo FOCUS (*Forum for the Co-ordination of Pesticides Fate Models and Their Use*; FOCUS, 2001). A relação entre o valor de toxicidade e a exposição é a razão toxicidade/exposição (TER). Os valores limite da TER dependem da exposição (aguda ou crónica) e das espécies utilizadas. Uma vez que os valores limite são uma estimativa de um conjunto concentração-resposta, é aplicado um fator de incerteza (UF) para garantir a proteção sobre outro organismo aquático não testado e que tenha uma sensibilidade mais elevada. Assim, para a toxicidade aguda o valor limite é > 100 para peixes e crustáceos e > 10 para as algas, para a toxicidade crónica o valor é > 10 para todas as espécies. Uma vez que um pesticida pode não cumprir o valor limite, são feitas avaliações de níveis mais elevados de efeitos a fim de refinar a avaliação de risco e reduzir as incertezas. Os níveis mais elevados de avaliação podem incluir resultados de testes de toxicidade de laboratório com espécies de ensaio adicionais (permitindo a distribuição da sensibilidade das espécies – explicado mais à frente), testes aquáticos de microcosmos e mesocosmos (modelos de ecossistema - ecossistemas experimentais feitos pelo homem que são construídos com base em elementos de ecossistemas reais) e os modelos populacionais e “*Food-web*” (Figura 2). O sistema de níveis como um todo precisa ser:

1. Adequadamente protetor;
2. Internamente consistente;
3. Custo-eficácia;
4. Resolver o problema com um maior grau de realismo e complexidade quando se vai de níveis mais baixos de avaliação para os mais elevados (Brock e Van Wijngaarden, 2012).

Na avaliação de risco de pesticidas, os dados de base requeridos para a avaliação de primeiro nível estão definidos no Regulamento (EC) nº 1107/2009 (EC, 2009). No entanto, os atuais dados para a avaliação de primeiro nível estão em discussão, uma vez que o novo Regulamento 1107/2009 não visa apenas uma proteção adequada das culturas contra os organismos prejudiciais, mas também uma proteção maior do ambiente e organismos não-alvo no âmbito da diretiva de produtos fitossanitários.

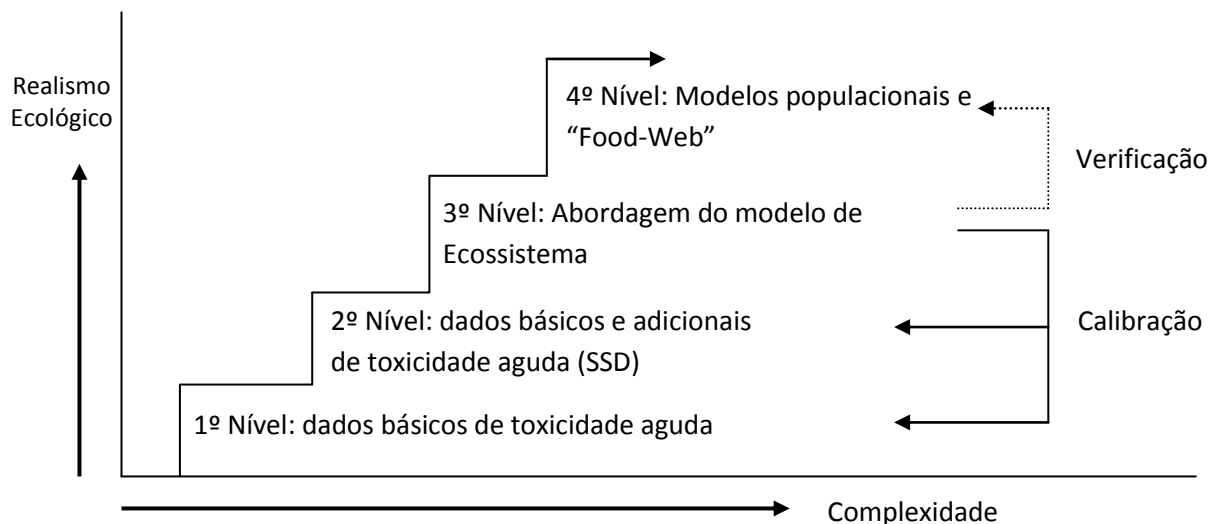


Figura 2 - Esquema da abordagem por níveis para a avaliação do efeito dos pesticidas (adaptado de Brock e Van Wijngaarden, 2012)

2.2 Distribuição da Sensibilidade das Espécies (SSD)

Uma das razões para que a ERA de primeiro nível tem sido considerada simples é o número limitado de espécies testadas e os valores elevados de UF, consequentemente aplicados. Uma maneira de ultrapassar essa barreira é incluir dados de toxicidade de organismos não-padrão no processo de avaliação do risco. Assim, a sensibilidade do conjunto de espécies mais diversificado pode ser obtido através da construção de curvas de distribuição da sensibilidade de espécies (SSD). Estas curvas são normalmente usadas para “reduzir a incerteza relativa a diferenças na sensibilidade de espécies em testes-padrão e noutras espécies potencialmente expostas na natureza e utiliza uma variação interespecífica na sensibilidade a tóxicos para prever efeitos ao nível da comunidade” (Posthuma et al., 2002). A curva SSD é definida como uma “função de distribuição cumulativa de toxicidade de um composto único ou de uma mistura de um conjunto de espécies que constituem uma comunidade” (Van den Brink et al., 2006). As curvas SSD podem ser úteis tanto nas avaliações prospetivas como nas retrospectivas. A avaliação prospetiva permite o cálculo da concentração que protege 95% das espécies (HC_5 - *hazard concentration 5%*), e retrospectivamente, pode ser utilizada para estimar a fração das espécies potencialmente afetadas (PAF) numa certa concentração do pesticida (ex. o PEC; Figura 3). Além destas aplicações, as curvas SSD também têm sido utilizadas nas comparações da sensibilidade de diferentes comunidades, por exemplo, de água doce *versus* água salgada e temperado *versus* tropical (ex. Maltby et al., 2005).

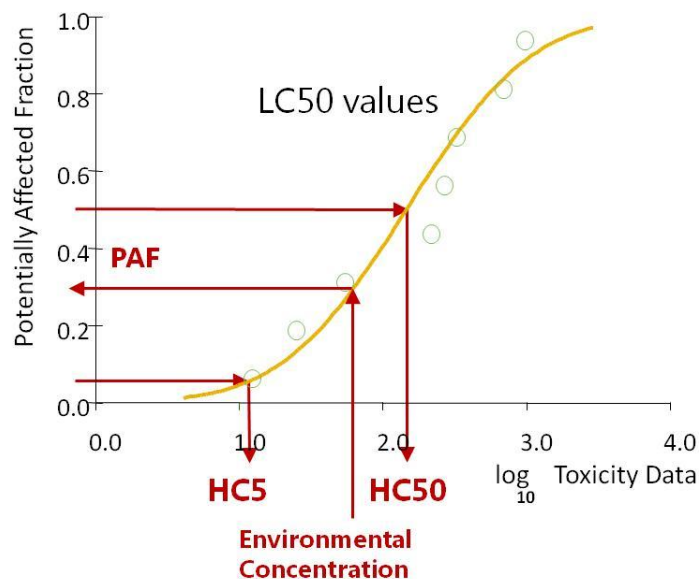


Figura 3 - Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD): cálculo das concentrações de risco (HC₅ e HC₅₀) para definição de normas de qualidade ambiental; cálculo da fração potencialmente afetada (PAF) a partir de uma concentração ambiental de pesticidas

Segundo Van den Brink et al. (2006) o conceito das curvas SSD, na avaliação de risco ambiental baseia-se em várias suposições, tais como:

- A amostra de espécies em que a curva SSD é baseada é uma seleção aleatória da comunidade de referência, assumindo a sua representatividade em relação à comunidade;
- Interações entre as espécies não influenciam a distribuição de sensibilidade;
- Uma vez que os *endpoints* funcionais não são normalmente incorporados nas curvas SSD, a estrutura da comunidade é alvo de preocupação;
- A sensibilidade de uma espécie de laboratório para alguns pesticidas é representativa da sua sensibilidade no campo;
- A proteção do percentual prescrito das espécies garante uma proteção "adequada" dos ecossistemas de campo.

Apesar das curvas SSD serem úteis para estimar e comparar a sensibilidade de conjuntos de espécies, não indicam as razões pelas quais uma espécie ou um conjunto de espécies é mais sensível a uma substância química que a outra. Recentemente, as diferenças na sensibilidade entre espécies distintas tem sido explicada através da utilização de *traits* de espécies, ou seja, das suas características. Por exemplo, Baird e Van den Brink (2007) utilizaram uma abordagem alternativa, com base na hipótese de que a sensibilidade dos organismos é função da sua biologia, podendo ser prevista a partir de características

como a morfologia, duração do ciclo de vida, fisiologia e alimentação. Com este estudo concluíram que quatro das características analisadas, nomeadamente tipo de respiração, categoria taxonómica, duração do ciclo de vida e massa corporal, foram as mais importantes para explicar as diferenças de sensibilidade entre as espécies. Dentro daquelas características, as espécies com respiração através da pele, ciclos de vida curtos, baixa massa corporal e crustáceos, têm maior sensibilidade em relação às outras. No entanto, uma vez que o conjunto de dados era limitado, foi necessário compilar mais informação sobre as características das espécies, de modo a aumentar a precisão e representatividade taxonómica desta abordagem.

Outra crítica às curvas SSD é que não permitem a avaliação dos efeitos indiretos, isto é, a cadeia de efeitos seguintes aos efeitos tóxicos diretos e o potencial dos ecossistemas depois de serem afetados. Experiências com modelos de ecossistema têm sido realizadas para obter essa informação (Daam e Van den Brink, 2011).

2.3 Procedimento de Avaliação de Risco Prospetivo – 1º nível - baseado no atual Documento de Orientação sobre Ecotoxicologia Aquática

No processo de avaliação de primeiro nível para os inseticidas, com base no atual e no novo relatório proposto, mas ainda não aprovado, pela UE constam os dados exigidos de toxicidade aguda para os organismos aquáticos. O procedimento de avaliação de risco é descrito no Documento de Orientação da UE sobre Ecotoxicologia aquática (SANCO, 2002) e no Regulamento n.º 544/2011 (EC, 2011). Assim, com base no documento atual as exigências para os vertebrados (peixes), algas e macrófitas e para os invertebrados são as seguintes (Figura 4):

Vertebrados (Peixes)

- Toxicidade Aguda

Os dados de toxicidade aguda para os peixes são sempre necessários para o *Oncorhynchus mykiss* e uma espécie de peixe de água quente.

- Toxicidade Crónica

Um estudo de toxicidade crónica deve ser realizado a menos que se possa justificar que a exposição prolongada ou repetida é improvável de ocorrer. Estes testes são importantes, pois são a única medida para avaliar os efeitos subletais. Um teste de toxicidade crónica deve ser exigido quando a DT_{50} da água-sedimento (tempo de degradação médio no sistema água-sedimento) é ≥ 2 dias a um pH entre 6-9. Há três testes diferentes para o estudo da toxicidade crónica:

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

Há algumas reservas em relação ao protocolo da OCDE 204 porque a mortalidade é o único *endpoint* considerado e a duração da exposição é de 14 dias. Além disso, o estágio de desenvolvimento testado não é particularmente sensível. No entanto, estudos que foram conduzidos de acordo com esse protocolo, nos últimos anos, incluem a exposição por 21 dias, com crescimento, mortalidade e comportamento como *endpoints*. Além disso, o estágio de desenvolvimento do *Oncorhynchus mykiss* pode ser testado, como é recomendado no protocolo da OCDE 215 para o “teste de crescimento juvenil”. A combinação dos dois protocolos é, portanto, mais apropriada. Assim, o estudo deve ter uma duração de exposição de 28 dias e incluir sobrevivência, crescimento e comportamento como *endpoints*.

Nalguns casos, pode ser necessário considerar um teste de ELS ou um FLC. Um valor limite $< 0,1$ mg/L para o teste ELS deve ser igualmente aplicável ao teste FLC. O teste FLC pode ser exigido se o BCF (fator de bioconcentração) for > 1000 , se a eliminação durante a fase de depuração 14 dias no estudo de bioconcentração for $< 95\%$ ou a substância for estável em água ou no sedimento ($DT_{90} > 100$ dias). No entanto, tendo em conta que este tipo de estudo é difícil de realizar, um teste FLC só pode ser exigido se obedecer aos três requisitos (valor limite $< 0,1$ mg/l, BCF > 100 e $DT_{90} > 100$ dias), caso contrário o teste a realizar deverá ser o ELS.

Plantas (Algas e Macrófitas)

Um teste com algas verdes é sempre necessário. Para os herbicidas e reguladores de crescimento de plantas (porque afetam os produtores primários) deve ser realizado um teste adicional. A segunda espécie deve ser de outro grupo de algas, como as diatomáceas ou as cianobactérias.

Os testes com macrófitas, tal como acontece com as algas, têm de ser realizados para herbicidas e reguladores de crescimento de plantas. Os testes devem ser realizados com a *Lemna sp.*. O número de frondes é o *endpoint* mais importante mas, por exemplo, se houver valores de toxicidade para a biomassa ou para outros parâmetros mais baixos que este podem ser usados para a avaliação de risco.

Invertebrados

A *Daphnia* é utilizada como representativa dos invertebrados devido à facilidade de cultura, à disponibilidade de protocolos internacionais tanto para a toxicidade aguda como para a crónica e a sua sensibilidade a substâncias tóxicas. Dados de toxicidade aguda são

sempre necessários e os dados da toxicidade crónica são, também, necessários se for esperada exposição prolongada ou repetida. Dados crónicos são, portanto, exigidos para compostos que são aplicados mais de uma vez por período cultural ou para aqueles cuja $DT_{50} \geq 2$ dias. Na avaliação de risco preliminar, fatores de incerteza de 100 e 10 são aplicadas aos *endpoints* agudos e crónicos, respetivamente, para explicar as diferenças potenciais na sensibilidade intraespécie e interespécie dos invertebrados e de outras fontes de incerteza. Para os herbicidas e fungicidas, os dados de toxicidade aguda e crónica da *Daphnia* são considerados devidamente representativos para os insetos aquáticos e outros invertebrados. Se a substância de ensaio é um inseticida, tem de se ter em atenção se esta tem um modo de ação específico, como por exemplo inseticidas neonicotinóides ou regulador de crescimento de insetos, pois nestes casos a sensibilidade de invertebrados pode não ser bem representada pela *Daphnia*. Se a toxicidade de um inseticida para *Daphnia* é baixa, ou seja, 48h $EC_{50} > 1$ mg/l (concentração efetiva média) ou 21d NOEC $> 0,1$ mg/l (concentração sem efeitos observáveis), isso pode indicar seletividade e deve então ser realizado um teste de toxicidade aguda com o *Chironomus riparius* (48h, teste somente de água). Os dados sobre a toxicidade do organismo mais sensível (*Daphnia* ou *Chironomus sp*) devem ser usados na avaliação de risco. Se o EC_{50} 48h para *Chironomus sp* é pelo menos dez vezes inferior aos valores de EC_{50} 48h da *Daphnia*, deverá ser feito um estudo de toxicidade crónica com *Chironomus sp*. Nestes casos, os valores limite que são aplicados à *Daphnia* devem, também, ser aplicados ao *Chironomus sp* (isto é, 100 para a toxicidade aguda e 10 para a toxicidade crónica).

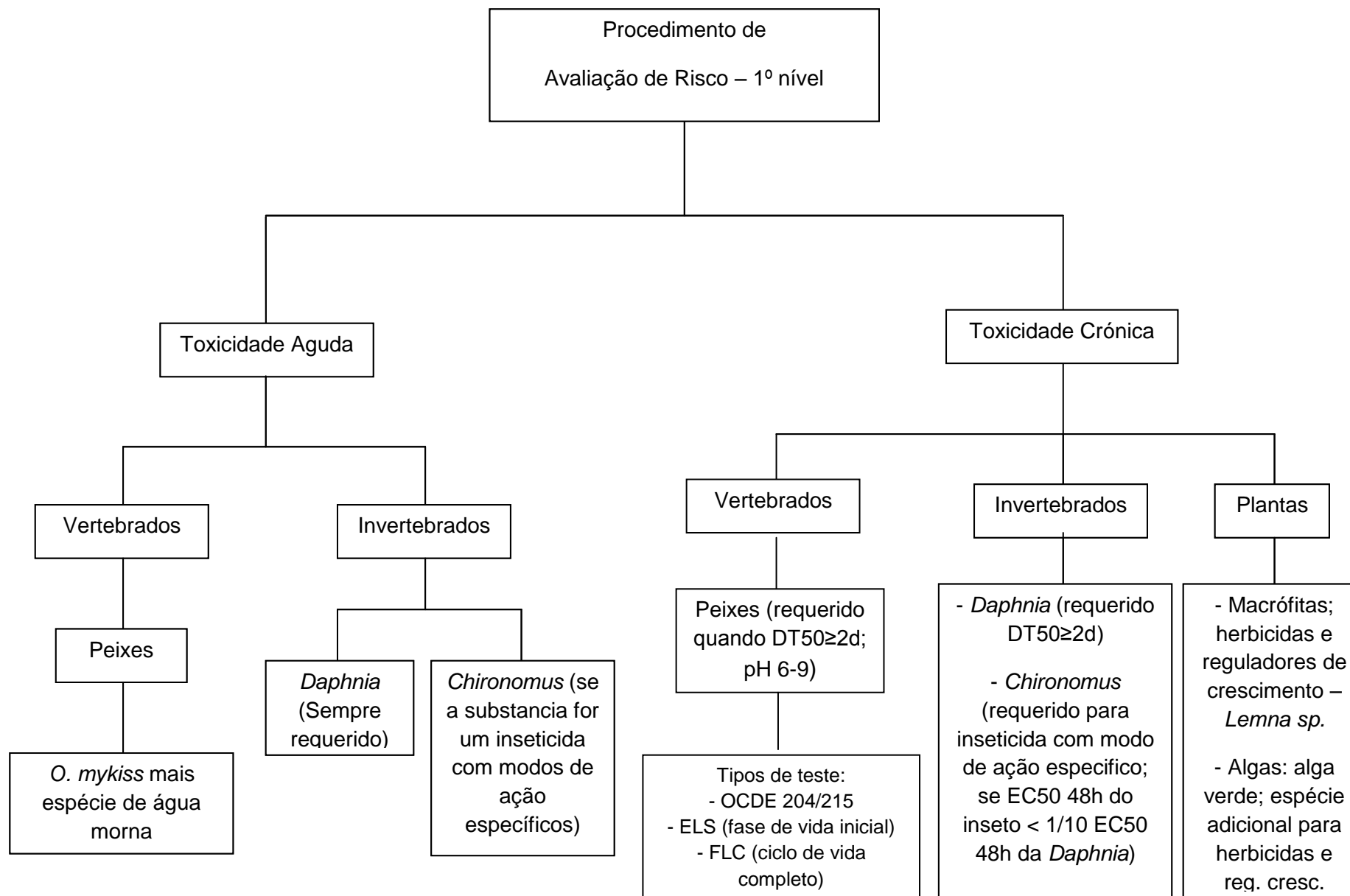


Figura 4 - Esquema do procedimento de avaliação de risco – 1º nível (adaptado do Documento de Orientação da UE sobre Ecotoxicologia aquática (SANCO, 2002)) 10

2.4 Procedimento de Avaliação de Risco Prospetivo baseado no novo Regulamento de Proteção dos Produtos Fitofarmacêuticos

Para a avaliação de risco de pesticida baseada no novo Regulamento de Proteção dos Produtos Fitofarmacêuticos (EC, 2009), a comissão reguladora (UE) propôs rever os dados exigidos na avaliação de primeiro nível para os organismos aquáticos. Assim, com base no novo regulamento, as exigências para os testes a realizar para a avaliação de risco para os vertebrados (peixes), algas e macrófitas e para os invertebrados são as seguintes:

Vertebrados (Peixes)

- Toxicidade Aguda

No novo regulamento apenas é exigido o teste de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), deixando de ser necessário o teste para uma espécie de água quente. Um teste para a toxicidade aguda dos peixes deve ser conduzido a 100 mg substância/L ou numa concentração adequada selecionada a partir de *endpoints* aquáticos, após análise da exposição. Quando a mortalidade é detetada no teste dos peixes, um estudo de dose-resposta será necessário para determinar a LC₅₀, utilizada na avaliação de risco.

- Toxicidade Crónica

Um estudo de toxicidade crónica para peixes é necessário para todas as substâncias onde a exposição em águas superficiais é provável e, a substância for considerada estável em água, ou seja, haja uma perda inferior a 90% da substância original em mais de 24 horas via hidrólise. No atual relatório da UE eram feitos três tipos diferentes de teste, no novo relatório há apenas dois tipos de testes diferentes:

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

Quando apenas é estudado a fase inicial de vida, o teste deve determinar os efeitos sobre o crescimento, desenvolvimento e comportamento e, os efeitos observados em estágios iniciais de vida dos peixes. A EC₁₀ e EC₂₀ devem ser referidas juntamente com o NOEC.

No caso de ser analisado o ciclo de vida completo, o teste deve determinar os efeitos sobre a reprodução e a viabilidade da geração descendente. Para as substâncias que não são disruptores endócrinos o teste do ciclo de vida completo dos peixes pode ser necessário, dependendo da persistência e da bioacumulação da substância.

Para as substâncias que preenchem os critérios de seleção, em qualquer um dos testes de rastreio ou onde há outras indicações de desregulação endócrina, *endpoints* adicionais devem ser incluídos no teste.

Plantas (Algas e Macrófitas)

– Efeito sobre o crescimento das algas

O teste é sempre necessário para uma alga verde (por exemplo, *Selenastrum capricornutum*). Este deve fornecer o EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀ e os correspondentes valores de NOEC para a taxa de crescimento das algas e rendimento, com base em medições da biomassa.

Tal como acontece nos testes de toxicidade aguda da *Daphnia magna* e de outras espécies de invertebrados aquáticos, o teste deve ser realizado até concentrações de 100 mg substância/L. Um teste a 100 mg substância/L pode ser realizado quando os resultados de uma gama de testes indicam que não são esperados efeitos em concentrações mais baixas.

Para substâncias que apresentem atividade herbicida deve ser realizado um teste numa segunda espécie de um grupo taxonómico diferente, por exemplo, *Navicula pelliculosa*.

– Efeito sobre macrófitas aquáticas

As macrófitas aquáticas são importantes produtores primários de ecossistemas aquáticos que devem ser protegidos de efeitos químicos adversos, a fim de manter a estrutura e as funções do ecossistema. As macrófitas têm várias funções importantes nos ecossistemas aquáticos, incluindo a conversão de energia solar e do dióxido de carbono em matéria orgânica; produção de oxigénio; sequestro de dióxido de carbono e no ciclo de nutrientes (Wetzel, 2001).

Para os testes sobre os efeitos tóxicos sobre as macrófitas aquáticas são necessários, tal como nos testes das algas, os valores de EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀ e os respetivos valores de NOEC. No caso das macrófitas, a espécie mais utilizada é a *Lemna sp.*, pelo que é preciso a sua taxa de crescimento e rendimento, com base nas medições do número de frondes e pelo menos uma variável adicional de medição (peso seco, peso húmido ou área dos frondes). Para outras espécies, os valores são baseados em medições de parâmetros de biomassa.

Um teste de laboratório com a *Lemna sp.* deve ser realizado para herbicidas, reguladores de crescimento das plantas e substâncias que evidenciem atividade de herbicida. Segundo Arts et al. (2010), esta espécie não é representativa de todas as macrófitas, devido a diferenças nos modos de exposição, taxa de recuperação e sensibilidade a produtos químicos com modos de ação específicos. Por isso, é necessário testes adicionais, como é proposto no novo relatório da UE, com outras espécies de macrófitas, consoante o modo de ação da substância ou se houver indicações claras de maior toxicidade para dicotiledóneas (a espécie mais utilizada será a *Myriophyllum aquaticum*) ou monocotiledóneas (*Glyceria maxima*).

Para as macrófitas, as condições de teste são iguais às das algas.

Invertebrados

Uma mudança importante na atualização proposta é a inclusão de uma segunda espécie de artrópode aquático (além da *Daphnia*), como a espécie Mysid shrimp (*Americamysis bahia*) ou o *Chironomus sp.*, na avaliação base. Consequentemente, quando no futuro próximo estas novas exigências forem implementadas, a toxicidade aguda de invertebrados aquáticos será, em primeira instância, avaliada com base em (1) EC₅₀ 48h para *Daphnia* (de preferência a *D. magna*) e (2) EC₅₀ 48h para *A. bahia* e/ou *C. riparius* (ou outra espécie de *Chironomus*, como *C. dilutus* ou *C. yoshimitsui*), ou outra espécie ainda não definida.

Segundo consta nesse Regulamento, o teste deve determinar a toxicidade aguda para as 24 e 48 horas da substância teste, expressa como EC₅₀ para a imobilização e, sempre que possível, a maior concentração que não provoca imobilização.

O teste deve ser realizado até concentrações de 100 mg substância/L. Um teste limite a 100 mg substância/L pode ser realizado quando os resultados de uma gama de testes indicam que não são esperados efeitos em concentrações mais baixas.

Em relação à toxicidade crónica é necessário um teste:

- Para todas as substâncias onde a exposição em águas superficiais é provável e, a substância é considerada estável em água, ou seja, há uma perda inferior a 90% da substância original em mais de 24 horas via hidrólise.

- Se os testes de toxicidade aguda foram realizados em mais que duas espécies de invertebrados aquáticos deve ter-se em consideração os *endpoints*, a fim de determinar as espécies adequadas a serem testadas no estudo de toxicidade crónica.

- Se a substância é um regulador de crescimento de insetos, então é necessário realizar um estudo adicional com o *Chironomus riparius*.

Quanto à reprodução e desenvolvimento da *D. magna* e de outros invertebrados aquáticos, o teste deve medir os efeitos adversos, tais como imobilização e reprodução e fornecer pormenores sobre os efeitos observados. Os valores de EC₁₀ e EC₂₀ devem ser avaliados, assim como o valor de NOEC.

A necessidade de realizar testes adicionais serve para corrigir o risco da toxicidade aguda e crónica que tenha sido identificada e fornecer informações e dados suficientes para avaliar o impacto potencial sobre organismos aquáticos nas condições de campo. Estes testes podem ser feitos com espécies adicionais, com alterações nos cenários de exposição, ou podem ser microcosmos ou mesocosmos, facto que tem vindo a ser estudado, mas ainda não se sabe qual a espécie adicional (para os invertebrados aquáticos) além da *D. magna* que deverá ser testada.

Este trabalho irá focar particularmente as alterações em relação aos invertebrados aquáticos.

2.5 Sensibilidade de invertebrados em relação à *Daphnia magna*

Foram vários os trabalhos realizados para estudar a sensibilidade dos invertebrados em relação à *Daphnia magna*, dos quais os três mais importantes vão ser aqui referidos: Wogram e Liess (2001), Van der Ohe e Liess (2004) e Brock e Wijngaarden (2012).

Wogram e Liess (2001) classificaram os macroinvertebrados de acordo com a sensibilidade a substâncias tóxicas, usando a ordem como nível taxonómico básico. Como a informação sobre qualquer espécie e substância é limitada, as suas sensibilidades relativas foram calculadas pela comparação com os dados de toxicidade da *Daphnia magna* (*Cladocera*). As espécies foram classificadas separadamente em relação a dois grupos: compostos orgânicos e compostos metálicos.

Foram consideradas as seguintes ordens: *Amphipoda*, *Cladocera*, *Coleoptera*, *Copepoda*, *Decapoda*, *Diptera*, *Ephemeroptera*, *Gastropoda*, *Heteroptera*, *Hirudinea*, *Isopoda*, *Lamellibranchia*, *Megaloptera*, *Odonata*, *Oligochaeta*, *Ostracoda*, *Plecoptera*,

Trichoptera e *Tricladida*. Os dados de toxicidade analisados foram restritos ao LC₅₀ e EC₅₀, a testes laboratoriais de água doce e com uma duração de exposição entre 1h a 96h. Os *endpoints* considerados foram: imunidade, intoxicação, mortalidade e reprodução. Cada concentração de efeito tóxico para uma determinada substância e espécie foi dividida pelo correspondente valor para a *D. magna*. As comparações foram feitas entre substâncias e espécies com o mesmo tempo de exposição e o com o mesmo *endpoint*.

Wogram e Liess (2001) concluíram que, para o grupo dos compostos orgânicos, as ordens *Amphipoda*, *Plecoptera* e *Cladocera* (sem a *Daphnia*) apresentaram menor tolerância relativamente à *D. magna*. As restantes ordens apresentaram valores de tolerância relativa superiores ou idênticos à da *D. magna*. Em relação aos compostos metálicos, todas as ordens, com exceção da *Cladocera* (sem a *Daphnia*), apresentaram valores superiores aos da *D. magna*. Obtiveram, assim, uma diferença significativa entre o grupo dos compostos orgânicos e o dos metálicos.

Von der Ohe e Liess (2004) com o objetivo de obterem mais informações sobre a sensibilidade das espécies a produtos químicos, agruparam os *taxa* de invertebrados aquáticos em relação à *D. magna*, dividindo em compostos orgânicos e metálicos, tal como Wogram e Liess (2001), mas apenas para valores de LC₅₀. A separação em compostos orgânicos e metálicos permitiu a classificação de um grande número de espécies de invertebrados aquáticos de acordo com a sua sensibilidade. Este estudo permitiu, também, refinar o conceito da classificação dos *taxa* de acordo com a sua sensibilidade, através da identificação do nível taxonómico mais baixo possível, consoante a disponibilidade de dados.

Para a realização do estudo foram consideradas 18 ordens: *Amphipoda*, *Basommatophora*, *Cladocera*, *Coleoptera*, *Decapoda*, *Diptera*, *Ephemeroptera*, *Heteroptera*, *Hirudinea*, *Isopoda*, *Eulamellibranchia*, *Megaloptera*, *Odonata*, *Oligochaeta*, *Plecoptera*, *Prosobranchia*, *Trichoptera*, e *Tricladida*, sendo que a ordem *Odonata* foi dividida em duas subordens: *Anisoptera* e *Zygoptera*. Os dados de toxicidade analisados foram restritos a testes de laboratório de água doce com uma duração de exposição de 24h e 48h. As comparações foram feitas, apenas, entre os valores que foram obtidos com a mesma substância e duração do ensaio. Para isso, o LC₅₀ da *D. magna* foi dividido pelo LC₅₀ de cada espécie para compostos orgânicos e metálicos.

Von der Ohe e Liess (2004), tal como Wogram e Liess (2001), concluíram que tanto para os compostos orgânicos como para os metálicos a *D. magna* está entre os mais sensíveis. Para os compostos orgânicos, cerca de 22% dos *taxa* investigados foram mais sensíveis do que *D. magna*. Em relação aos compostos metálicos foi de aproximadamente

30%. Por isso, os autores concluíram que é legítimo afirmar que em geral, a *D. magna* é protetora para a maioria dos *taxa*.

Um estudo, mais recente, foi o de Brock e Wijngaarden (2012) onde foi analisada qual a espécie (*Americamysis Bahía* e/ou *Chironomus spp*) que deverá ser incluída na avaliação de primeiro nível para inseticidas, segundo o novo requisito proposto pela UE, uma vez que ainda não está definida qual a espécie a adicionar, além da *D. magna*. Foi também analisada a inclusão do macrocrustáceo *Gammarus pulex*, uma vez que tem sido amplamente utilizado em testes de toxicidade e no desenvolvimento de modelos ecotoxicológicos (por exemplo, Galic et al., 2010; Ashauer et al., 2007, 2011). Foram utilizadas concentrações limite, observadas em estudos de microcosmos e mesocosmos com inseticidas, para calibrar o primeiro nível do processo de avaliação de efeito dos inseticidas.

Foram estudados 31 inseticidas agrupados nas seguintes categorias: organofosforados, carbamatos, piretróides, reguladores de crescimento de insetos, neocotinóides, biopesticidas e outros tipos de pesticidas. Os critérios utilizados para selecionar os dados de toxicidade das espécies únicas (*single-species*) foram a duração (48-96h) e os *endpoints* (imobilidade ou mortalidade). Cada estudo foi classificado numa de duas categorias: regime de exposição única ou regime de exposição repetida. Para cada composto e regime de exposição a NOEC_{eco} (concentração sem efeitos observáveis no ecossistema) de ensaios com modelos de ecossistemas foi obtida a partir de testes de concentrações sem efeitos ambientais significativos (classe de efeito um) ou efeitos leves em amostras individuais (classe de efeito dois) para o *endpoint* mais sensível. A NOEC_{eco} foi, em seguida, comparada com as concentrações legislativas aceitáveis (RAC) para os artrópodes de primeiro nível, com base em dados de toxicidade aguda para a *D. magna*, *A. bahia*, *C. spp.* e *G. pulex*, obtidos em ensaios de *single species*. Essas RACs foram comparadas com a NOEC_{eco}, na proporção de 1:1 (Figura 5). Compostos com valores situados abaixo da linha significa que os testes de toxicidade são protetores dos efeitos ambientais para as comunidades de artrópodes.

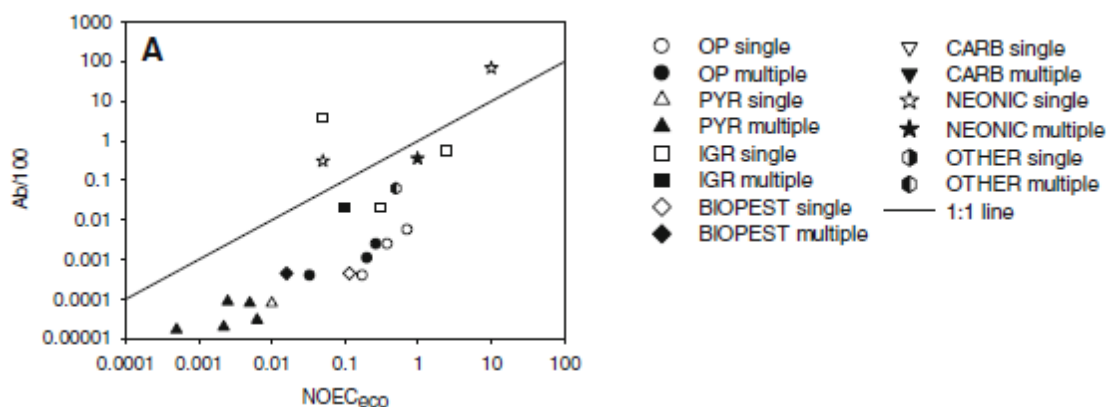


Figura 5 – Gráfico de comparação da $NOEC_{eco}$ com as RAC para os artrópodos de primeiro nível, com base em dados de toxicidade aguda ($Ab/100$). A linha representa a proporção de 1:1 (RAC/ $NOEC_{eco}$) (Adaptado de Brock e Wijngaarden, 2012).

Brock e Wijngaarden (2012) concluíram que, com base nas anteriores exigências, há proteção ou não dependendo do modo de ação do inseticida avaliado. No caso dos organofosforados, carbamatos e piretróides, com base em dados de toxicidade aguda para a *D. magna*, ou combinação destes com o *C. riparius* (28d $NOEC/EC_{10}$), a maioria encontra-se protegido. No entanto, para outros inseticidas (principalmente neonicotinóides e reguladores de crescimento de insetos) não há proteção completa, principalmente quando apenas os dados da *D. magna* são considerados.

O procedimento de avaliação com base nos novos requisitos parece ser protetor para a grande maioria dos inseticidas avaliados em estudos com microcosmos e mesocosmos. Quanto a *G. pulex* é geralmente protetora para as neurotoxinas (organofosforados, carbamatos e piretróides), no entanto, para os neocotinóides e reguladores de crescimento de insetos, pode não ser uma espécie representativa, embora seja melhor que a *D. magna*. Concluíram, também, que a avaliação de primeiro nível com base nos valores da *D. magna*, *A. bahia* e/ou *Chironomus spp.* é, em geral, protetora para os efeitos ecológicos, em contraste com uma avaliação apenas baseada na *D. magna*. A avaliação de primeiro nível precisa ser reavaliada criticamente sempre que surja um pesticida com novos modos de ação (Brock e Wijngaarden, 2012).

No presente trabalho, será feita a avaliação do novo requisito proposto, ou seja, a necessidade da inclusão de uma segunda espécie (*A. bahia* ou *Chironomus spp.*) nos testes de toxicidade aguda, para a avaliação de primeiro nível nos inseticidas, como indicado no novo documento SANCO. Neste trabalho, serão utilizados dados de bioensaios, ao contrário do que se verificou no estudo de Brock e Wijngaarden (2012), onde foram utilizados dados de modelos de ecossistemas. A principal vantagem da utilização dos bioensaios está

relacionada com a grande quantidade de dados disponíveis para diferentes espécies. Assim, por exemplo, a ausência de informação sobre uma dada espécie nos modelos de ecossistema pode levar à conclusão de que essa espécie está protegida e, quando a análise é feita com base em dados de bioensaios (onde há mais informação disponível), essa espécie pode não se encontrar protegida.

3. Materiais e Métodos. Resultados e Discussão

Os materiais e métodos, tal como os resultados obtidos neste estudo e a sua discussão, são apresentados nas páginas seguintes em formato de artigo, a ser submetido posteriormente a revista científica.

1 Cover Page

2

3 Regular paper

4 2012/10/18

5 Text Pages: 21

6 Number of Tables: 9

7 Number of Figures: 2

8 Title: Environmental risk assessment of pesticides to aquatic ecosystems -
9 representativeness of the standard test species of invertebrates

10

11

12 Name of authors: Santos, L., Cerejeira, M.J., Daam, M.A.*

13 Affiliations: Instituto Superior de Agronomia, Technical University of Lisbon, Tapada da Ajuda,
14 1349-017 - Lisboa, Portugal.

15

16 Full telephone, Fax No. and E-mail address of the corresponding author*:

17 Tel: + 351 21 365 3224

18 Fax: +351 21 365 3430

19 mdaam@isa.utl.pt

20

21

22

23

24

25 **Environmental risk assessment of pesticides to aquatic ecosystems -**
26 **representativeness of the standard test species of invertebrates**

27
28 **Santos, L., Cerejeira, M.J., Daam, M.A.***

29 Instituto Superior de Agronomia, Technical University of Lisbon, Tapada da Ajuda,
30 1349-017 Lisboa, Portugal

31
32 * Corresponding author: mdaam@isa.utl.pt

33
34 **Abstract**

35 With the main aim of verifying whether *Daphnia magna* is sufficient for the evaluation
36 of the environmental risk of pesticides to aquatic ecosystems, toxicity values of 218
37 insecticides were analyzed. For each one the relative tolerance (Trel) value was calculated to
38 compare the sensitivity of species from different taxonomic groups with that of *D. magna*.
39 The taxonomic groups were grouped in arthropods, non-arthropod invertebrates, fish,
40 algae/macrophytes and based on Trel values the species sensitivity distribution (SSD) were
41 defined. For the arthropods the influence of the mode of action (MOA) on vulnerability to the
42 insecticide was also analyzed. Still in the arthropods group, for each species, the class, order
43 and family they belong to were identified. To check the necessity of inclusion of a second
44 species studies of relationship were performed, between *D. magna*, *Americamysis bahia* and
45 *Chironomus riparius*. As far as the SSD curves are concerned, for the different groups the
46 most sensitive one was the arthropods group in both values of EC₅₀ and NOEC. Taking into
47 consideration MOA the group of neonicotinoids was the most sensitive one in EC₅₀ case and
48 the GABA – gated chloride channel antagonists in NOEC. The most sensitive taxonomical
49 group was *Mysida* and it was the combination of *Daphnia* plus *A. Bahia* that generated the
50 greater percentage of protection.

51
52
53 **Keywords:** Environmental Risk Assessment, Aquatic invertebrates, Insecticides, Aquatic
54 ecosystem, Mode of action, Species sensitivity distributions

57 1. Introduction

58 In the 20th century, the use of pesticides was intensified to increase productivity of
59 yields. Since irrigation canals surrounding agricultural fields may become contaminated with
60 pesticide residues via spray drift, drainage, run-off and/or accidental spills, undesirable side-
61 effects on aquatic organisms may ensue. To protect sensitive freshwater ecosystems from
62 pesticide stress, jurisdictions of many countries have set water quality criteria and started to
63 require a prospective Environmental Risk Assessment (ERA) before registration of a
64 pesticide (Daam and Van den Brink, 2011).

65 The process of defining criteria in tiers in ERA has frequently been recommended in
66 risk assessments of pesticides (for example Solomon et al., 2008). The concept of tiered
67 approaches is to start with a simple conservative assessment and to do additional more
68 complex assessments only in case this first assessment indicates potential risks. The first-
69 tier is based on results of laboratory single species toxicity tests with a limited number of
70 standard test species and the application of an uncertainty factor (UF). Subsequent higher
71 tiers may include results of laboratory toxicity test with additional test species (for example
72 the species sensitivity distribution (SSD) approach), aquatic micro-/mesocosm tests (model
73 ecosystem approach), and population models. To overcome the uncertainty coming from the
74 limited number of species tested in the first-tier evaluation is to also include toxicity data of
75 non-standard test organisms in the risk evaluation process, by constructing species
76 sensitivity distributions (SSD). The SSD concept is used to reduce the uncertainty resulting
77 from differences in the sensitivity of standard test species and those expected to be exposed
78 in nature and uses interspecific variation in sensitivity to toxicants to predict effects at the
79 community level (Posthuma et al., 2002). The SSD curves may be useful for both
80 prospective and retrospective assessments. The prospective evaluation allows the
81 calculation of the concentration that protects 95% of the species (HC_5 - hazard concentration
82 5%) and retrospectively can be used to estimate the fraction of the species that would
83 potentially be affected (PAF; potentially affected fraction) at a measured or predicted
84 environmental concentration (PEC). The SSDs do not provide the reasons why one species
85 or species assemblage is more sensitive to a chemical than another.

86 The risk assessment procedure on basis of the current data requirement is described
87 in the EU Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology (SANCO, 2002) and in Commission
88 Regulation No 544/2011 (EC, 2011). Regarding aquatic invertebrates, the *Daphnia magna*
89 test is always required and the *Chironomus riparius* is only required when the substance is
90 an insecticide with specific modes of action. For pesticide risk assessment under the new
91 Plant Protection Product Regulation (EC, 2009), commission regulation (EU) proposals

92 circulate to revise the basic data requirement for the first-tier aquatic effect assessment. An
93 important change in the proposed update is the inclusion of an acute test for a second
94 aquatic arthropod species (besides *Daphnia*) such as the Mysid shrimp (*Americamysis*
95 *bahia*) and/or larvae of the insect *Chironomus spp.*

96 Brock and Wijngaarden (2012) recently published a study in which they analyzed the
97 additional species to be included in the first-tier acute effect assessment for insecticides
98 (*Americamysis Bahia* and/or *Chironomus spp.*), according to the new aquatic data
99 requirement proposed by EU, since it's not yet clear which species to add, in addition *D.*
100 *magna*. They also analyzed the inclusion of macro crustacean *Gammarus pulex*, since it has
101 been widely used in toxicity testing and is often used as focal species for developing
102 ecotoxicological models (for example Galic et al., 2010; Ashauer et al., 2007, 2011). They
103 used threshold concentrations observed in microcosm and mesocosm studies treated with
104 insecticides to calibrate the first-tier acute effect assessment procedure. They studied 31
105 insecticides allocated in the following categories: organophosphates, carbamates,
106 pyrethroids, insect growth regulators, neonicotinoids, biopesticides and other types of
107 insecticides. Criteria used to select single-species toxicity data were endpoint (immobility or
108 mortality) and duration (48-96h). Each study was classified into one of two exposure
109 categories: a single pulse exposure regime or a repeated exposure regime. They concluded
110 that, whether the old requirements are protective or not seems to depend on the specific
111 toxic mode-of-action (MOA) of the insecticide that is evaluated. In the case of
112 organophosphates, carbamates and pyrethroids, acute toxicity data for *D. magna*, or the
113 combination of this data with data for *C. riparius* (28d NOEC/EC₁₀) are protective in most
114 cases. However, for other insecticides with other MOAs (neonicotinoids and insect growth
115 regulators) this appears not to be the case, especially when only data of *D. magna* are used.
116 The procedure on basis of the new data requirements appears to be protective for the vast
117 majority of insecticides evaluated in micro/mesocosms. The evaluation of the first-tier on the
118 basis of values of *D. magna*, *A. bahia* and/or *Chironomus spp.* overall is protective for
119 ecological effects in contrast to an assessment on basis of *Daphnia* alone.

120 The objective of this work was to verify whether *Daphnia magna* is enough for the
121 evaluation of the environmental risk of pesticides in aquatic ecosystems, or if there is the
122 necessity of including more standard species to assure that all species are protected. The
123 evaluation of this necessity of inclusion of more species has been made according to the
124 new Plant Protection Product Regulation (EC, 2009), incising on the changes that will appear
125 on the aquatic invertebrates. In this work will be used bioassays data and not ecosystem
126 models, like the ones used by Brock and Wijngaarden (2012). The advantage of using
127 bioassays is related to the large amount of data available for different species. Thus, for

128 example, the absence of information about a given species in ecosystem models may lead to
129 the conclusion that this species is protected, and when the analysis is based on bioassays
130 data (where there is more information available), this species cannot be protected.

131

132 **Materials and Methods**

133 2.1 Database construction

134 In a list of 327 compounds for which an EU Draft Assessment report (DAR) is
135 available (<http://dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision>), the type of pesticide (insecticide,
136 acaricide, herbicide, plant growth inhibitor, nematocide, repellent, molluscicide, rodenticide,
137 fungicide and bactericide) was determined according to the information available on the EU
138 pesticides database ([http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/ public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm)). In case no
139 such information was available in this database, the DARs were consulted.

140 For each compound, the Ecotoxicology section related with the effects on aquatic
141 organisms of the respective DAR was consulted for: chemical name of the compound; CAS
142 number; chemical group; types of organisms studied (fish, algae, invertebrates); type of
143 exposure (acute or chronic); test substance (active substance or formulated product);
144 species Latin name; test conditions (dynamic, semi-static or static); endpoint; test duration
145 and respective unit; toxicity value type (EC₅₀, LC₅₀, NOEC or LOEC) and respective value;
146 test location (laboratory or field); type of water (freshwater or saltwater); and mode of action
147 of the pesticide (MOA).

148 The chemical group and the mode of action of the pesticides were taken from other
149 sources, since the DAR reports didn't have that information. Consequently, the chemical
150 group has been taken from the EU Pesticides Database and from footprint pesticide
151 database (<http://www.eu-footprint.org/>). As far as the mode of action is concerned, it has
152 been consulted the MOA Categorization Plan from the IRAC (*Insecticide Resistance Action*
153 *Committee*) (IRAC, 2011).

154 For further analysis, only synthetic compounds were considered with an insecticidal
155 mode of action, as indicated on the EU pesticide database and DARs. Hence, all compounds
156 with no insecticidal MOA and/or from natural origin (e.g. plant-derived like pyrethrins or
157 microorganism-derived like *Bacillus thuringiensis*) were omitted. This resulted in 60
158 insecticides and/or acaricides that were subsequently studied in detail.

159 For the 60 studied pesticides, the toxicity data were taken from the Ecotox database
160 (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>), with the exception of 13 insecticides, for which there were no
161 files available in the database. For the 47 files, it was checked the ones who didn't have data
162 for *Daphnia magna* and these ones were left out (still remaining 34 insecticides), since the
163 main objective of the study is to compare the values of the endpoints from *Daphnia magna*
164 with the other species, so that the values of Trel (relative tolerance) may be calculated.
165 Besides these ones, also the files that had values for *Daphnia* and were not available in DAR
166 reports were taken from the Ecotox database. It was necessary to confirm, in each file, which
167 were the insecticides and/or acaricides. For that the EU pesticides database and Pesticide
168 Action Network PAN Pesticides database (<http://www.pesticideinfo.org>) have been
169 consulted. When these two databases didn't have the required information, it has also been
170 consulted the footprint database. After separating the insecticides and/or acaricides it has
171 remained a total of 218 insecticides to be worked on. For each insecticide only the data that
172 fulfilled all the selection criteria that are summarized on Table 1 were considered. These
173 criteria have been utilized to "reduce variability in endpoint and test duration" (Van den Brink
174 et al., 2006). In case more than one value was available for the same species-compound
175 combination, the geometrical mean of these values was used.

176 2.2 Relative tolerance calculations

177 To enable a comparison of threshold values from 218 insecticides, the threshold
178 concentrations had to be "normalised". This was done by transforming these concentrations
179 to relative tolerance (Trel) values by dividing them by the (geometric mean of) threshold
180 value(s) of *Daphnia magna*. Trel has been calculated separately for the values of EC₅₀ and
181 NOEC, through the following formulas:

$$T_{rel} = \frac{EC50_i}{EC50_{D.magna}} \quad T_{rel} = \frac{NOEC_i}{NOEC_{D.magna}}$$

182 The EC_{50i} corresponds to the EC₅₀ value of a non-standard species "i" and the EC_{50D}.
183 *magna* corresponds to the *D. magna* value. For the NOEC values, NOEC_i corresponds to the "i"
184 species' value and NOEC_{D magna} corresponds to the *D. magna* value. A Trel value equal to
185 one means that the species studied has a relative tolerance that is equal to *D. magna*. For
186 species with less tolerance (more sensitive) the values are lower than one and the species
187 with higher tolerance have values that are superior to one.

188 For the pesticides which have data on the DAR reports and on the EPA database, it
189 has been made the comparison between the values from the *D. magna* for the EC₅₀ and
190 NOEC. This comparison was performed to compare the DAR reports and EPA database.

191 2.3 Species sensitivity distributions

192 The toxicity data of the insecticides were grouped for arthropods (including the
193 insects and crustaceans), non arthropods invertebrates (including the invertebrates, molluscs
194 and worms), fish and algae/macrophytes, for EC_{50} and NOEC data separately. For each
195 group, SSDs were constructed based on the Trel values calculated as described above.
196 SSDs were constructed using ETX software, version 2.0 (Van Vlaardingen et al., 2004) that
197 also provides the values of HC_5 and HC_{50} (hazardous concentration at a 5% level and 50% of
198 the species, respectively), as well as their 95% confidence intervals. SSDs were only
199 constructed for those groups for which more than five values were available. In case more
200 than 200 values (maximum number of data that the ETX software can calculate) were
201 available, the average of the Trel was calculated so that each group contained around 200
202 values. This software calculates hazardous concentrations, assuming a lognormal
203 distribution of the toxicity data using the methodology described by Aldenberg and Jaworska
204 (2000). ETX also includes the Anderson-Darling Test for goodness of fit on log-normality,
205 which was evaluated at the 5% significance level. For the groups that passed the Anderson-
206 Darling test, the SSD curves were made to check the most sensitive and least sensitive
207 groups.

208 For the arthropods group the influence of the modes of action (MOA) of each
209 insecticide was analysed, and then the ETX software was used as described previously, but
210 now for each type of MOA. It was also made separately for the values of EC_{50} and NOEC
211 and for the MOA that pass on the Anderson-Darling test the SSD curves was made, for
212 verifying which MOA was most sensitive.

213 Still for the arthropods, it has been identified, for each species their class, order and
214 family that they belong to. Considering the taxonomical orders, the Trel percentage that is
215 below to one has been calculated, as well as the confidence interval at 95%, with the
216 objective of verifying which taxonomical orders were most sensitive.

217

218 2.4 Studies of interrelation

219 Since the main objective of this study was to evaluate the necessity of including a
220 second arthropod species in the aquatic risk assessment of insecticides, the *A. Bahia* or the
221 *Chironomus sp.*, for the acute toxicity and since it's not yet clear which species to add,
222 studies of interrelation were made (the first one only with *D. magna*; the second one with *D.*
223 *magna* and *C. riparius*; the third one with *D. magna* and *A. Bahia*, the fourth one only with *A.*

224 *Bahia* and the last one only *C. riparius*). The objective of these tests was to verify which test
225 protected a higher number of species.

226 For the studies of interrelation was necessary to analyze each of the 218 insecticides,
227 only EC₅₀ values for each combination and calculate Trel values. For the test only *D. magna*,
228 the Trel calculation was done as described above. In test *D. magna* and *C. riparius* were
229 analyzed all insecticides/acaricides containing data of the two species (*D. magna* plus *C.*
230 *riparius*) and a third (species i) were necessary to calculate the Trel and the data that fulfilled
231 all the selection criteria that are summarized on Table 1. The Trel was calculated using the
232 following formula:

$$T_{rel} = \frac{EC50_i}{EC50_{D.magna\ or\ C.riparius}}$$

233 The EC_{50i} corresponds to the EC₅₀ value of a non-standard species “i” and the EC_{50 D.}
234 *magna* or *C. riparius* corresponds to the *D. magna* or *C. riparius* value. The value of the denominator
235 corresponds to the lowest EC₅₀ value of *D. magna* and *C. riparius*.

236 For the remaining tests, the procedure was the same but with *D. magna* and *A. bahia*,
237 only with *A. bahia* and finally with only *C. riparius*, with or without in combination with *D.*
238 *magna*.

239

240 **2. Results and Discussion**

241 After consulting the DAR reports, it was noted that there were some slight
242 incoherencies between the contained data in the summary tables and the data provided in
243 the text. For example, in the DAR report of fenazaquin, where in the table NOEC value is <35
244 µg/L and in the text the NOEC value is < 25,1 µg/L for *Poecilia reticulata* in the acute toxicity.
245 When this fact occurred the data from the text were considered correct. In other cases, there
246 were some data contained in the tables but not in the text; these data were included in the
247 analysis. When for a toxicity value of a certain substance both nominal and measured
248 concentrations were recorded, the measured concentrations were used.

249 Furthermore, in the case where the test substance was a formulated product, the
250 toxicity values were inserted, when possible, using the concentration of the active substance
251 tested. When there were only the values of the formulated product, this was referred
252 between parentheses; these data were excluded in the analysis.

253 In the comparison between the *D. magna* values from the EPA database and the
254 DAR, the ratio based on 34 EC₅₀ values of insecticides was 1.4 ± 2.4 (mean \pm SD); in relation
255 to NOEC 12 ratios could be calculated, with an mean \pm SD of 1.7 ± 3.1 . These values were
256 proof a consistence between the two databases, because as referred by Van Wijngaarden
257 (2006) it is know that even in standardized laboratory single species tests with the same
258 compounds, variability in responses may be a factor of three or more between laboratories.

259 There were studied 5976 toxicity data (5806 acute values and 170 chronic values –
260 Table 2) for the construction of SSD curves for different taxonomic groups which were
261 separated for arthropods, invertebrate non arthropods, fish and algae/macrophytes both for
262 the acute values (EC₅₀) and for the chronic values (NOEC). The values of HC₅ and HC₅₀ with
263 basis on EC₅₀ and NOEC, as well as the confidence intervals at 95% and PAF for the four
264 groups have been synthesised in Table 3. As far as the acute and chronic Trel values are
265 concerned, the most sensitive group is the arthropods one. This can be confirmed by the
266 values of PAF. For example, in NOEC PAF has a value of 60, which means that 60% of the
267 species-compound combinations in that taxonomical group has greater sensitivity that the
268 one showed by *D. magna*.

269 In their study Baird and Van den Brink (2007) had as main objective to analyse the
270 sensitivity of the species contained in a database. Since they had data for a great number of
271 substances with different mode of action and chemical properties, they studied the relative
272 sensitivity according to their chemical concentration. They chose to use approach of Wogram
273 and Liess (2001), representing the response of a species to a given substance relative to a
274 standard test species - the freshwater crustacean *Daphnia magna*. In the Baird and Van den
275 Brink (2007) study, as in ours, the conclusion achieved was that the great majority of the
276 studied species were relatively less sensitive than *D. magna*. Generally, molluscs and inferior
277 invertebrates were less sensitive to toxic substances than the crustaceans and the insects
278 (arthropods).

279 Figure 1 represents the SSD curves for the four studied taxonomic groups using all
280 the chronic toxicity data (NOEC) available. All of them have a lognormal distribution, as
281 confirmed by the Anderson–Darling test at the significance level of 5%. By observing this
282 figure it can be concluded that the arthropods group (group that is at the left of the figure)
283 was the most sensitive one and, on the contrary, was the algae/macrophytes group (group
284 that is at the right of the figure) that was the less sensitive to the studied insecticides.

285 Maltby et al. (2005) collected acute toxicity data resulting from single species tests for
286 16 insecticides. These data were used to investigate the importance of the selection in test-
287 species in the construction of a SSD and of the subsequent estimated hazardous

288 concentrations (HCs) to protect the aquatic ecosystems. SSDs were made separately for
289 arthropods, vertebrates, non arthropod invertebrates and algae for each one of the 16
290 insecticides. Maltby et al. (2005) verified that the most sensitive group was the arthropods
291 one. Naturally this is the result of these insecticides mode of action, that is, they are
292 designed to kill arthropods. For example, diflubenzuron inhibits chitin production and,
293 therefore, is highly toxic to arthropods, but it has low toxicity to vertebrates and non
294 arthropods invertebrates (Maltby et al. 2005). Again, our results are in agreement with the
295 achieved results in these previous studies.

296 As far as mode of action were studied 2076 data, which 2024 are related acute
297 values and 52 are related chronic values (Table 4).

298 The compounds for which EC_{50} values in the arthropods group were available could
299 be attributed to 11 different mode of action (summarised in Table 5): Acetylcholinesterase
300 (AChE) inhibitors, Ecdysone receptor agonists, GABA-gated chloride channel antagonists,
301 Inhibitors of chitin biosynthesis, type 0, Inhibitors of mitochondrial ATP synthase, Juvenile
302 hormone mimics, Mitochondrial complex I electron transport inhibitors, Nicotine acetylcholine
303 receptor (nAChR) agonists, Octopamine receptor agonists, Sodium channel modulators and
304 Uncouplers of oxidative phosphorylation via disruption of the proton gradient. The MOA
305 Nicotine acetylcholine receptor (nAChR) agonists appears to be the most sensitive one as
306 compared to *D. magna* (the percentage of PAF is of 97%). This MOA mimics agonists action
307 of acetylcholine at nAChRS, causing hyperexcitation. Acetylcholine is the major excitatory
308 neurotransmitter in the insect central nervous system.

309 Through the SSD curve provided in Figure 2, it is also observed that the MOA
310 Nicotine acetylcholine receptor (nAChR) agonists was the most sensitive one, because the
311 curve of this MOA is oriented on the left side of the figure. On the opposite side, that is, the
312 least sensitive MOA was Octopamine receptor agonists that is located more at the right of
313 the figure. Still in Figure 2, there are only represented nine MOA since there are two MOA
314 Inhibitors of chitin biosynthesis, type 0 and the Mitochondrial complex I electron transport
315 inhibitors that did not pass the Aderson–Darling test for lognormality (as shown in Table 5).
316 Consequently, they were not represented in the graphic.

317 It is important to emphasize that the mode of action Nicotine acetylcholine receptor
318 (nAChR) agonist was only based on data from imidacloprid, the only insecticide with this
319 mode of action for which data were available in the database. There are some studies where
320 the effects of the neonicotinoids, group of insecticides that have a level of toxicity highly
321 selective for insects and the biological activity is based on the interference with the nicotinic
322 acetylcholine receptors, have been studied (Beketov and Liess, 2008). One of those studies

323 was the one made by Beketov and Liess (2008) that as main aim had to study the freshwater
324 arthropods sensitivity in relation to the neonicotinoid thiacloprid. It was concluded that *D.*
325 *magna* was the least sensitive out of seven arthropods tested and that the mosquito *C.*
326 *pipiens* would be more adequate to predict the effects of neonicotinoid insecticides.

327 Miranda et al. (2011) made a study where the environmental impact of neonicotinoids
328 registered for agricultural use in Brazil was studied (acetamiprid, clothianidin, imidacloprid,
329 thiacloprid e thiamethoxam). Based on EC₅₀ values of ten arthropod taxa, they concluded
330 that also for imidacloprid *D. magna* was the species that was least sensitive. According to
331 these authors, *D. magna* is the least sensitive species from the taxa for which EC₅₀ data
332 could be obtained.

333 As far as NOEC values are concerned, only for three MOAs more than five values
334 were available and, therefore, only those three were used for the HC₅ and HC₅₀ calculation
335 with the ETX software. The three MOA were: Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, GABA-
336 gated chloride channel antagonists, Sodium channel modulators. The most sensitive MOA
337 on the NOEC values was the GABA-gated chloride channel antagonists with a PAF 97%
338 (Table 6). This MOA is responsible for the blocking of the GABA-activated chloride channel,
339 causing hyperexcitation and convulsions. GABA is the major inhibitory neurotransmitter in
340 insects. As was the case for the EC₅₀ of neonicotinoids, also for the NOEC of GABA-gated
341 chloride channel antagonists only data were obtained for one insecticide (endosulfan). There
342 is a need for studies evaluating a range of test species for other insecticides with these
343 MOAs.

344 Still in relation to the arthropods group, it has been identified, for each species, the
345 class, order and family they belong to. This was made to evaluate whether there was a
346 common taxonomic order that was structurally more sensitive than *D. magna*. 28
347 taxonomical orders were identified for the acute toxicity values and 12 for the chronic toxicity
348 (Tables 7 and 8, respectively).

349 With regard to the taxonomical orders of the acute toxicity, 32% are more sensitive
350 relating to *D. magna* (*Conchostraca*, *Semionotiformes*, *Siphonostomatoida*, *Mysida*,
351 *Diplostraca*, *Calanoida*, *Podocopida*, *Amphipoda* and *Plecoptera*). Although it was not the
352 order that has a higher Trel, it was *Mysida* (order where *A. bahia* belongs to) that presents a
353 greater sensitivity comparing to *D. magna*, with a PAF of 72% (that is 72% of the species of
354 this order have a greater sensitivity than *D. magna*). Although the orders *Conchostraca*,
355 *Semionotiformes*, and *Siphonostomatoida* have a Trel percentage of 100% they were based
356 on only one or two species. According to the new data requirements of the EU on the
357 evaluation of the aquatic effect of insecticides, *A. bahia* is one of the species that has been

358 suggested to be included in the acute toxicity tests (SANCO, 2010). The percentage of
359 taxonomical orders that have a below sensitivity compared to *D. magna* is 57%
360 (*Harpacticoida*, *Decapoda*, *Trichoptera*, *Zygoptera*, *Isopoda*, *Cladocera*, *Heteroptera*,
361 *Diptera*, *Coleoptera*, *Odonata*, *Sessilia*, *Anostraca*, *Megaloptera*, *Cyclopoida*, *Arguloidea* and
362 subclass *Copepoda*). Yet, there are three orders (*Ephemeroptera*, *Notostraca* and
363 *Podocopa*) that have a Trel percentage of 50%, that is, 50% of the species of these orders
364 have a lower sensitivity than *D. magna* and the other 50% have a greater sensitivity.

365 Von der Ohe and Liess (2004) grouped together the LC₅₀ data of aquatic invertebrate
366 taxa and related their sensitivity to that of *D. magna*, dividing them into organic compounds
367 and metal compounds. They concluded that both for the organic compounds and for metal
368 compounds *D. magna* is included among the most sensitive ones. For the organic
369 compounds, around 22% of the taxa investigated were more sensitive than *D. magna*. For
370 metal compounds the percentage was approximately 30%. For that reason they concluded
371 that it is legitimate to assert that, in general, *D. magna* is a good toxicity preserver for the
372 majority of the taxa (Von der Ohe and Liess 2004). In our study with insecticides the result
373 was similar since that only 32% of the considered orders presented a greater sensitivity than
374 *D. magna*. However, we also demonstrated this not only for organic compound level, but
375 MOA.

376 Referring to chronic toxicity, 67% of the considered orders presented a greater
377 sensitivity than *D. magna* (*Calanoida*, *Cladocera*, *Odonata*, *Plecoptera*, *Harpacticoida*,
378 *Mysida*, *Diplostraca* and *Decapoda*) and 25% a below sensitivity (*Diptera*, *Ephemeroptera*
379 and *Heteroptera*). In this case, only one order (*Amphipoda*) had a Trel percentage of 50%,
380 indicating a sensitivity comparable to that of *D. magna*.

381 With the objective of verifying the necessity of including a second aquatic arthropod in
382 the aquatic risk assessment, as indicated in the new draft SANCO working document
383 (SANCO 2010), *A. bahia* or *Chironomus sp.*, in the last stage have been made studies of
384 interrelation. These results are summarized in Table 9.

385 In Table 9 we can verify that the combination *D. magna* and *A. bahia* presents a lower
386 percentage of unprotected compound/organisms, that is, this was the case where there were
387 more protected species. However, the most interesting aspect was to verify that *A. bahia* by
388 itself had a higher percentage of protection, when compared to sole testing of *D. magna*.
389 Brock and Van Wijngaarden (2012) developed a study where they evaluated the usefulness
390 of acute toxicity tests with *Daphnia magna*, *Americamysis bahia*, *Chironomus riparius* and
391 *Gammarus pulex* as to analyse the implications of the new requirements of EU on the
392 evaluation of the aquatic effect of insecticides. They observed that, with basis on the most

393 sensitive acute toxicity data for *D. magna* and *A. bahia*, they showed similar value of
394 NOEC_{eco} (no observed effect concentration ecosystem) than when the effect assessment is
395 based on acute toxicity of *A. bahia*, illustrating that in general the acute EC₅₀ value for *A.*
396 *bahia* is lower than that for *D. magna*. By observing Table 9 this aspect was also verified
397 since the percentage to unprotected compound/organisms was of 0,8% in *D. magna* plus *A.*
398 *Bahia* case and of 1,3% only with *A. bahia*.

399 If we analyse the case of the neonicotinoid imidacloprid we have 15 available data,
400 from which only four are protected by *D. magna*, and that is in agreement with the previously
401 achieved result, where the neonicotinoids are the most sensitive ones relating to *D. magna*.
402 Analysing the same 15 data, but now only with *A. bahia*, all of them are protected, and that
403 may indicate that *A. bahia* is a good species for the study of neonicotinoids sensitivity (PAF =
404 1,3%). This also can be showed in the study performed by Brock and Van Wijngaarden
405 (2012): the *A. Bahia* EC_{50/100} value for two neonicotinoids was a factor of six to seven higher
406 than the corresponding NOEC_{eco} (*vide* Figure 5, in point 2.5 of this thesis). Further research
407 is needed to confirm this for a greater number of compounds, especially for those where *D.*
408 *magna* seems to be less protective.

409 Despite this, observing that the total number of data was superior in the case of *D.*
410 *magna* (2637) comparing to *A. bahia* (1886) and, consequently, some compounds/organisms
411 that are not protected by *D. magna* do not have related data for *A. bahia*, therefore it cannot
412 be undoubtedly stated if *A. bahia* protects or not. An example of this was chlorfenvinphos
413 where *D. magna* was not protective and there was no data for the sensitivity in relation to *A.*
414 *bahia*. This fact can lead us to the idea (eventual wrong) that the percentage of protection of
415 *A. bahia* is superior to the percentage of protection of *D. magna*, due to the lack of data.

416

417 **3. Conclusions**

418 The objective of this work was to verify whether *Daphnia magna* is enough for the
419 evaluation of the environmental risk of pesticides in aquatic ecosystems, or if there is the
420 necessity of including more standard species to assure that all species are protected.

421 With the elaboration of the work, the following conclusions can be drawn:

422 - For both acute (EC₅₀) and for chronic (NOEC) values the group of arthropods was
423 the most sensitive, with a PAF of 43% for EC₅₀ and 60% for NOEC. These results were
424 expected, since only insecticides/acaricides were studied. According to Maltby et al. (2005)

425 this is the result of these insecticides mode of action, that is, they are designed to kill
426 arthropods.

427 - In the arthropods group, for EC₅₀ values, the MOA Nicotine acetylcholine receptor
428 (nAChR) agonists appears to be the most sensitive one as compared to *D. magna* (the
429 percentage of PAF is of 97%). *D. magna* is little adequate to predict the effects of
430 neonicotinoid insecticides.

431 - With regards to the taxonomical orders of the acute toxicity, the order *Mysida* (order
432 where *A. bahia* belongs to) presents a greater sensitivity comparing to *D. magna*, with a PAF
433 of 72%. This is very important, because according to the new data requirements of the EU on
434 the evaluation of the aquatic effect of insecticides, *A. bahia* is one of the species that has
435 been suggested to be included in the acute toxicity tests (SANCO, 2010).

436 - In the studies of interrelation that were made to verify the necessity of including a
437 second aquatic arthropod, *A. bahia* or *Chironomus sp*, we can verify that the combination *D.*
438 *magna* and *A. bahia* was the case where we can verify a larger number of protected species.

439 - However, the most interesting aspect was to verify that *A. bahia* by itself had a
440 higher percentage of protection, when compared to sole testing of *D. magna*. Despite this,
441 observing that the total number of data was superior in the case of *D. magna* (2637)
442 comparing to *A. bahia* (1886) and, consequently, some compounds/organisms that are not
443 protected by *D. magna* do not have related data for *A. bahia*, therefore it cannot be known if
444 *A. bahia* protects or not. This fact can lead us to the idea that the percentage of protection of
445 *A. bahia* is superior to the percentage of protection of *D. magna*, due to the lack of data.

446 - *D. magna* is representative for the sensitivity of arthropods to most insecticides,
447 however, for some specific modes of action such as neonicotinoids, may not be a good
448 indicator. The *A. bahia* can be a good species for the study of neonicotinoids sensitivity,
449 since it protected most arthropods (PAF=1,3%). However, only imidacloprid was considered
450 and the data numbers are low. Further research is needed to confirm this for a greater
451 number of compounds, especially for those where *D. magna* seems to be less protective.
452 Hence, the present study also provided important indications of what type of insecticides
453 (MOA) and arthropod taxa (orders) should be studied additionally.

454

455

456

457 **4. References**

- 458 Aldenberg, T., Jaworska, J.S. 2000. Uncertainty of hazardous concentrations and fraction
459 affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 1-18.
- 460 Ashauer, R., Boxall, A.B.A., Brown, C.D., 2007. Simulating toxicity of carbaryl to *Gammarus*
461 *pulex* after sequential pulsed exposure. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5528-5534.
- 462 Ashauer, R., Hintermeister, A., Potthof, E., Escher, B.I., 2011. Acute toxicity of organic
463 chemicals to *Gammarus pulex* correlates with sensitivity by *Daphnia magna* across most
464 modes of action. *Aquat. Toxicol.* 103, 38-45.
- 465 Baird, D.J., Van den Brink, P.J., 2007. Using biological traits to predict species sensitivity to
466 toxic substances. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 67, 296-301.
- 467 Beketov, M.A., Liess, M. 2008. Acute and delayed effect of the neonicotinoid insecticide
468 thiacloprid on seven freshwater arthropods. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 461-470.
- 469 Brock, T.C.M., Van Wijngaarden, R.P.A., 2012. Acute toxicity tests with *Daphnia magna*,
470 *Americamysis bahia*, *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex* and implications of new EU
471 requirements for the aquatic effect assessment of insecticides. *Environ. Sci Pollut Res.* DOI
472 10.1007/s11356-012-0930-0.
- 473 Daam, M.A., Van den Brink, P.J., 2011. Risk Assessment of Agrochemicals on Irrigation
474 Water Quality. *Acta Horticulturae.* 922, 41-47.
- 475 EC, 2009. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European parliament and the council of 21
476 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and
477 repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Off J Eur Union* 309, 1-50.
- 478 EC, 2011. Commission Regulation (EU) No 544/2011 of 10 June 2011 implementing
479 Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council as regards the
480 data requirements for active substances. *Off J Eur Union* 155, 1-66.
- 481 Galic, N., Hommen, U., Baveco, H., Van den Brink, P.J., 2010. Potential application of
482 population models in the European ecological risk assessment of chemicals II: review of
483 models and their potential to address environmental protection aims. *Integr. Environ. Assess.*
484 *Manag.* 6, 338-360.
- 485 IRAC (2011). IRAC MoA Classification Scheme, version 7.1. Insecticide Resistance Action
486 Committee. Available via:
487 http://www.irac-online.org/content/uploads/2009/09/MoA_Classification.pdf

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

491 Miranda, G.R.B., Raetano, C.G., Silva, E., Daam, M.A., Cerejeira, M.J., 2011. Environmental
492 fate of neonicotinoids and classification of their potential risks to hypogean, epygean, and
493 surface water ecosystems in Brazil. Hum. Ecol. Risk Assess. 17, 981-995.

494 Posthuma, L., Traas, T.P., Suter, G.W., 2002. The Use of Species Sensitivity Distributions in
495 Ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

496 SANCO, 2002. Guidance document on aquatic ecotoxicology in the context of the Directive
497 91/414/EEC. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General,
498 SANCO/3268/2001 rev. 4 (final), Brussels, Belgium.

499 SANCO, 2010. Commission Regulation (EU) No .../... of [...] amending Commission
500 Regulation (EU) No xxxx/2010 laying down the requirements for the dossier to be submitted
501 for the approval of active substance contained in plant protection products. European
502 Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, SANCO/11802/2010 rev.
503 00, Brussels, Belgium.

504 Solomon, K.R., Brock, T.C.M., De Zwart, D., Dyer, S.D., Posthuma, L., Richards, S.M.,
505 Sanderson, H., Sibley, P.K. and Van den Brink, P.J. 2008. Extrapolation in the context of
506 criteria setting and risk assessment. In: Solomon, K.R., Brock, T.C.M., De Zwart, D., Dyer,
507 S.D., Posthuma, L., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K. and Van den Brink, P.J.
508 (eds.). Extrapolation Practice for Ecotoxicological Effect Characterization of Chemicals,
509 SETAC Europe Press, Brussels, Belgium, p. 1-32.

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

513 Van Vlaardingen, P., Traas, T.P., Wintersen, A.M., Aldenberg, T., 2004. ETX 2.0. A program
514 to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed
515 toxicity data. RIVM Report No. 601501028/2004, Bilthoven, The Netherlands.

516 Van Wijngaarden, R.P.A., 2006. Interpretation and extrapolation of ecological responses in
517 model ecosystems stressed with non-persistent insecticides. ISBN 90-3270349-8,
518 Wageningen, The Netherlands.

519 Von der Ohe, P.C., Liess, M., 2004. Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to
520 organic and metal compounds. Environ. Toxicol. Chem. 23, 150-156.

521 Wogram, J., Liess, M., 2001. Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic
522 compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67,
523 360-367.

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543 **Figures and Tables**

544

545 **Table 1** – Data selection criteria used in acute toxicity and chronic toxicity (Van den Brink et al., 2006)

Acute toxicity

Endpoint: L(E)C₅₀ mortality, immobilization (animals) or biomass, growth (plants)

Test duration (days): fish 2-21, invertebrate 1-7, macrophytes 2-28, algae 1-7

Chronic toxicity

Endpoint: NOEC or EC₅₋₁₀: growth, feeding, reproduction, mortality or immobilization

Test duration (days): fish >20, invertebrate >6, macrophytes >6, algae >2

546

547

548

549 **Table 2** – Total data analyzed for different taxonomic groups (arthropods, invertebrates non arthropods, fish and
550 algae/macrophytes) for acute values (EC₅₀) and chronic values (NOEC)

	EC₅₀	NOEC
	Data analyzed	Data analyzed
Arthropods	2637	64
Non arthropods invertebrates	731	28
Fish	2290	45
Algae/ Macrophytes	148	33
Total	5806	170

551

552

553

554

555

556

557 **Table 3** - Values of HC₅ and HC₅₀ with basis on acute (EC₅₀) and chronic (NOEC) Trel values, as well as the
 558 confidence intervals at 95% and PAF for the different taxonomic groups. The PAF in Trel = 1 (that is, the
 559 sensitivity of the D. magna) is also indicated.

	EC ₅₀				NOEC			
	HC ₅	HC ₅₀	PAF	C.I. 95%	HC ₅	HC ₅₀	PAF	C.I. 95%
Arthropods	0,005	1,83	43	[-2342; 9270]	0,002	0,46	60	[4516; 4713]
Non arthropods invertebrates	0,124	98,73	13	[-32694; 227905]	0,002	16,35	30	[-1378; 17802]
Fish	0,012	10,02	29	[-2969; 16621]	0,004	5,96	34	[192; 1484]
Algae/ Macrophytes	0,066	20,20	19	[34,33; 2604]	1,750	1613,73	3.6	[-319109; 10002813]

560

561

562 **Table 4** - Total data analyzed for different mode of action for acute values (EC₅₀) and chronic values (NOEC)

	EC ₅₀	NOEC
	Data analysed	Data analysed
Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors	1318	29
GABA-gated chloride channel antagonists	107	7
Sodium channel modulators	479	6
Inhibitors of chitin biosynthesis, type 0	28	4
Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists	17	2
Juvenile hormone mimics	19	3
Mitochondrial complex I electron transport inhibitors	22	1
Inhibitors of mitochondrial ATP synthase	14	No data
Octopamine receptor agonists	5	
Ecdysone receptor agonists	9	
Uncouplers of oxidative phosphorylation via disruption of the proton gradient	6	
Total	2024	52

563

564 **Table 5** - EC₅₀ values for the different modes of action based on hazardous concentrations (HC₅ and HC₅₀) and
 565 the potentially affected fraction (PAF) and confidence intervals 95%. The PAF in Trel = 1 (that is, the sensitivity of
 566 the D. magna) is also indicated.

	EC ₅₀			
	HC ₅	HC ₅₀	PAF	C.I. 95%
Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors	0,032	6,596	28	[-4229; 16226]
Ecdysone receptor agonists	0,007	0,149	85	[0,12; 0,56]
GABA-gated chloride channel antagonists	0,0006	0,096	78	[-3,82; 28,28]
Inhibitors of chitin * biosynthesis, type 0	0,006	11,141	30	[-8884; 62230]
Inhibitors of mitochondrial ATP synthase	0,007	2,463	40	[-395; 1305]
Juvenile hormone mimics	0,020	1,014	50	[-4,13; 25,36]
Mitochondrial * complex I electron transport inhibitors	0,665	43,701	6.6	[96,48; 284]
Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists	2,00E-05	0,003	97	[-0,69; 2,24]
Octopamine receptor agonists	0,198	28,250	12	[-248; 892]
Sodium channel modulators	0,002	0,576	56	[-406; 1608]
Uncouplers of oxidative phosphorylation via disruption of the proton gradient	0,023	0,300	80	[0,08; 1,17]

567 * Data did not pass the Aderson-Darling test on log-normality at the 5% level

568

569

570 **Table 6** - NOEC values for the different modes of action based on hazardous concentrations (HC₅ and HC₅₀) and
 571 the potentially affected fraction (PAF) and confidence intervals 95%. The PAF in Trel = 1 (that is, the sensitivity of
 572 the D. magna) is also indicated.

	NOEC			
	HC ₅	HC ₅₀	PAF	C.I. 95%
Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors	0,025	2,476	37	[-76,70; 348]
GABA-gated chloride channel antagonists	0,0008	0,026	97	[0,003; 0,16]
Sodium channel modulators	0,003	0,193	76	[-0,64; 3,55]

573 **Table 7** - Trel percentage of less than 1; confidence interval of 95% and the total number of species in different
 574 taxonomic order for acute exposure

Taxonomic order	% Trel < 1	C.I. 95%	n
Conchostraca	100		1
Semionotiformes	100		1
Siphonostomatoida	100	[-0,38; 1,33]	2
Mysida	72	[0,84; 2,98]	100
Diplostraca	65	[-70,04; 519]	183
Calanoida	63	[-83,13; 288]	46
Podocopida	60	[-0,55; 18,83]	15
Amphipoda	59	[9,78; 99,47]	236
Plecoptera	54	[-268; 952]	110
Ephemeroptera	50	[-6,09; 65,06]	124
Notostraca	50	[-0,14; 4,40]	4
Podocopa	50	[-6,88; 27,45]	4
Harpacticoida	46	[1,60; 5,10]	28
Decapoda	45	[88,75; 3686]	531
Trichoptera	45	[-18,93; 158]	53
Zygoptera	42	[3,38; 19,38]	12
Isopoda	40	[-526; 3480]	30
Cladocera	39	[-767; 2383]	23
Heteroptera	39	[29,37; 210]	51
Diptera	36	[-1634; 7335]	825
Coleoptera	33	[0,97; 105]	42
Odonata	28	[-375; 1570]	65
Sessilia	22	[-6460; 35843]	9
Anostraca	20	[2333; 7033]	75
Megaloptera	17	[-533; 5629]	6
Cyclopoida	15	[-682; 3919]	34
Arguloidea	0		1
subclass Copepoda	0	[-3979; 16413]	3

575

576

577

578

579

580

581

582

583 **Table 8** - Trel percentage of less than 1; confidence interval of 95% and the total number of species in different
 584 taxonomic order for chronic exposure

Taxonomic order	% Trel < 1	C.I. 95%	n
Calanoida	100	[-0,02; 0,09]	2
Cladocera	100	[-0,07; 0,78]	2
Odonata	100		1
Plecoptera	100		1
Harpacticoida	67	[-1,66; 5,24]	3
Mysida	64	[-269; 848]	11
Diplostraca	59	[0,57; 3,71]	22
Decapoda	55	[-8,95; 41,84]	11
Amphipoda	50	[-0,51; 1,65]	2
Diptera	43	[-25,08; 365]	7
Ephemeroptera	0		1
Heteroptera	0		1

585

586

587

588

589 **Table 9** – Studies of relationships (the first one only with *D. magna*; the second one with *D. magna* and *C.*
 590 *riparius*; the third one with *D. magna* and *A. bahia*; the fourth one only with *A. bahia* and the last one only with *C.*
 591 *riparius*) to verify the necessity of including a second specie of aquatic arthropod, where it is indicated the
 592 percentage of compound/organism unprotected and the total number of data

Organisms	% of unprotected organisms	n
<i>D. magna</i>	6,8	2637
<i>D. magna + C. riparius</i>	1,9	1386
<i>D. magna + A. bahia</i>	0,8	1806
<i>A. Bahia</i>	1,3	1886
<i>B. Riparius</i>	9,8	1416

593

594

595

596

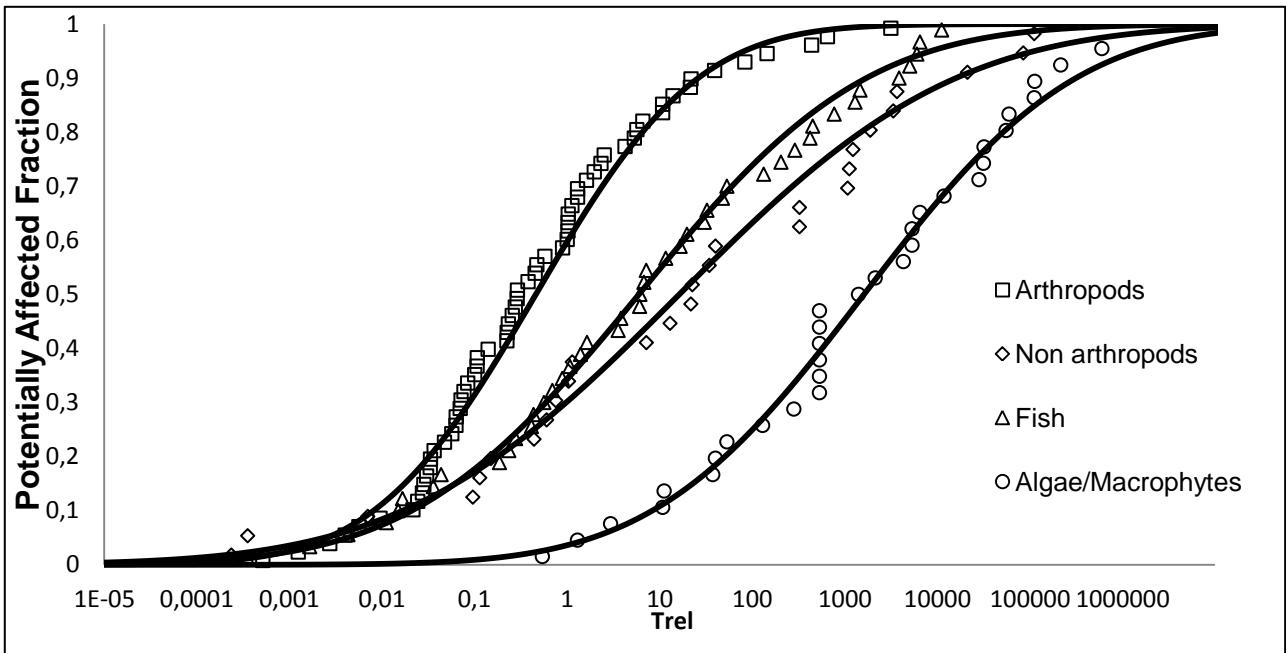


Figure 1 - Species sensitivity distribution (SSD) based on Chronic (NOEC) Trel values for arthropods, non arthropods invertebrates, fish and algae/macrophytes. The distribution curves were constructed using the ETX software. Log-normality was tested and accepted

597

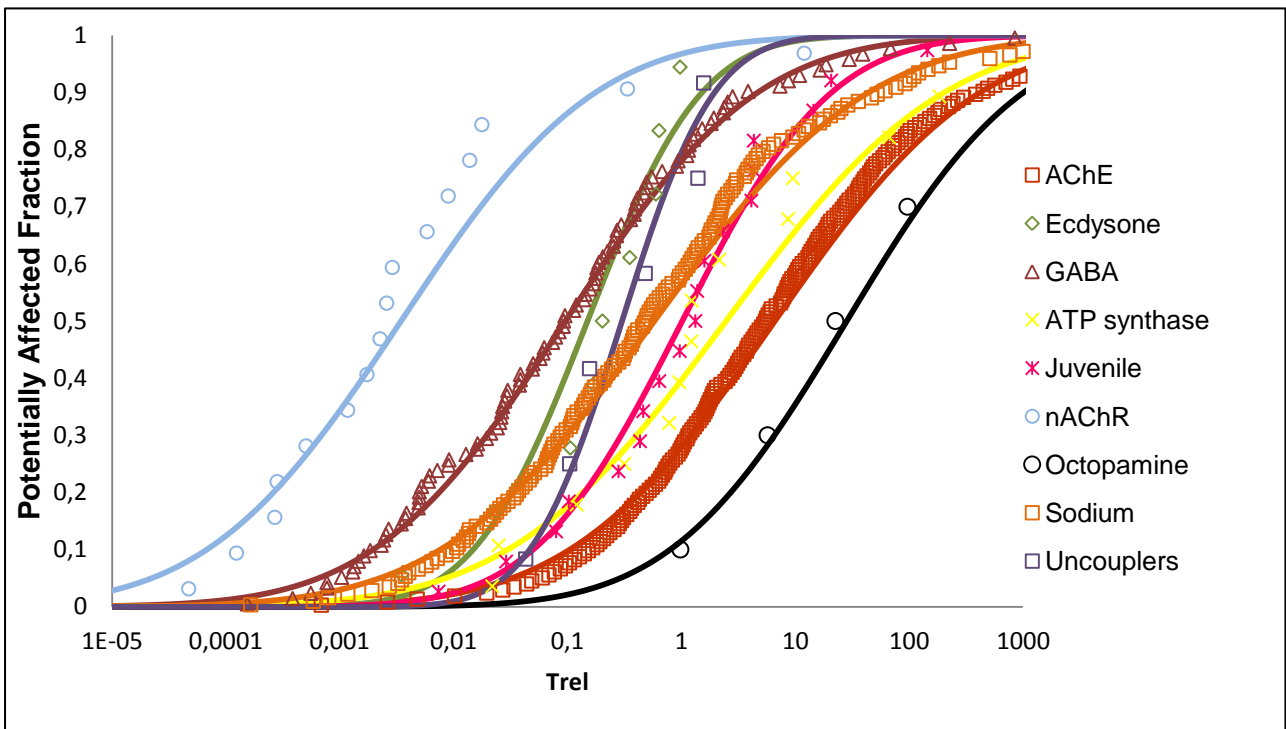


Figure 2 - Species sensitivity distribution (SSD) based acute toxicity for different mode of action. The distribution curves were constructed using the ETX software. The nine MOA passed the Anderson-Darling test ($p=0.05$).

598

599

4. Conclusões

O objetivo deste trabalho foi verificar com base em dados de toxicidade se a *Daphnia magna* é suficiente, como teste padrão a testar, para a avaliação do risco ambiental dos pesticidas em ecossistemas aquáticos ou se haveria necessidade de inclusão de mais espécies padrão para proteger os invertebrados aquáticos. Esta inclusão seria para garantir que todas as espécies ficariam protegidas.

Com a realização do trabalho chegou-se às seguintes conclusões:

- Tanto para os valores agudos (EC_{50}) como para os crónicos (NOEC) foi o grupo dos artrópodes o mais sensível, com uma PAF de 43% para o EC_{50} e de 60% para o NOEC, o que seria de esperar, uma vez que foram estudados apenas inseticidas/acaricidas. Segundo Maltby et al. (2005) é um resultado do modo de ação destes inseticidas, isto é, eles são projetados para matar artrópodes.

- No grupo dos artrópodes, para os valores de EC_{50} , o modo de ação mais sensível foi o grupo dos neonicotinóides, com uma PAF de 97%. Este grupo é responsável pela imitação da ação da acetilcolina nos nAChRs, causando hiperexcitação. A acetilcolina é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central dos insetos. A *D. magna* é pouco sensível aos neonicotinóides, sendo por isso inadequada para a sua avaliação de risco.

- Nos artrópodes, a ordem taxonómica que apresentou uma sensibilidade superior à da *D. magna* foi a *Mysida* (ordem a que pertence a *A. bahia*), com um Trel de 72%. É um aspeto muito importante, uma vez que de acordo com as novas exigências da UE na avaliação do risco aquático de inseticidas, a *A. bahia* é uma das espécies que tem vindo a ser estudada para ser incluída nos testes de toxicidade aguda (SANCO, 2010).

- Nos testes que foram feitos para verificar a necessidade de inclusão de uma segunda espécie de artrópode aquático, a *A. bahia* ou o *Chironomus sp.*, foi na combinação *D. magna* e *A. bahia* que houve um maior número de espécies protegidas.

- Contudo, o mais interessante foi verificar que a *A. bahia* só por si tem uma percentagem de proteção superior, quando comparada com os valores da *D. magna*. No entanto, observou-se que o número total de dados foi bastante superior no caso da *D. magna* (2637) do que na *A. bahia* (1886), o que faz com que alguns compostos/organismos que não são protegidos pela *D. magna*, não têm dados em relação à *A. bahia*, logo não se pode saber se esta protege ou não. Este facto, pode levar a que a percentagem de proteção da *A. bahia* seja superior à da *D. magna* devido à falta de dados.

- A *D. magna* é representativa para a maioria dos inseticidas, no entanto para alguns com modos de ação específicos como os neonicotinóides, pode não ser um bom indicador. A *A. bahia* pode ser uma espécie representativa para o estudo da sensibilidade dos neonicotinóides, uma vez que protegeu todos os dados de neonicotinóides. Contudo, apenas foi considerado o imidaclopride e o número de dados é bastante baixo o que faz com que não seja suficiente para se ter a certeza se a *A. bahia* é um bom indicador para a sensibilidade dos neonicotinóides. São necessárias mais pesquisas, para um maior número de compostos, especialmente para aqueles onde a *D. magna* parece ser menos protetora. Assim, o presente estudo também forneceu indicações importantes dos tipos de inseticidas (MOA) e os taxa de artrópodes que ainda deverão ser estudados.

Referências Bibliográficas

Arts, G., Davies, J., Dobbs, M., Ebke, P., Hanson, M., Hommen, U., Knauer, K., Loutseti, S., Maltby, L., Mohr, S., Poovey, A., Poulsen, V., 2010. AMEG: the new SETAC advisory group on aquatic macrophyte ecotoxicology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 820-823.

Ashauer, R., Boxall, A.B.A., Brown, C.D., 2007. Simulating toxicity of carbaryl to *Gammarus pulex* after sequential pulsed exposure. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5528-5534.

Ashauer, R., Hintermeister, A., Potthof, E., Escher, B.I., 2011. Acute toxicity of organic chemicals to *Gammarus pulex* correlates with sensitivity by *Daphnia magna* across most modes of action. *Aquat. Toxicol.* 103, 38-45.

Baird, D.J., Van den Brink, P.J., 2007. Using biological traits to predict species sensitivity to toxic substances. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 67, 296-301.

Brock, T.C.M., Lahr, J., Van den Brink, P.J., 2000. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems Part 1: Herbicides. Wageningen, The Netherlands. Alterra report No. 088.

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.

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.* L327, 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.

FOCUS, 2001. FOCUS Surface Water Scenarios in the EU Evaluation Process under 91/414/EEC. Report, EC Document Reference SANCO/4802/2001-rev.1. Report of the FOCUS Working Group on Surface Water Scenarios, Brussels, Belgium.

Galic, N., Hommen, U., Baveco, H., Van den Brink, P.J., 2010. Potential application of population models in the European ecological risk assessment of chemicals II: review of models and their potential to address environmental protection aims. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 6, 338-360.

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.

OCDE, 2000. Fish, Juvenile growth test, Test Guideline 215, OCDE Guidelines for testing of chemicals. OCDE, Paris.

OCDE, 1984. Fish, prolonged toxicity test: 14 – Day study, Test Guideline 204, OCDE Guidelines for the testing of chemicals. OCDE, Paris.

Posthuma, L., Traas, T.P., Suter, G.W., 2002. *The Use of Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

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, p. 1-32.

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.

Von der Ohe, P.C., Liess, M., 2004. Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 150-156.

Wetzel, R.G., 2001. *Limnology: lake and river ecosystems*. Monograph – 3rd ed. Academic, New York, p1006.

Wogram, J., Liess, M., 2001. Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 360-367.