

ECOTOX - BRASIL

Ecotoxicol. Environ. Contam., v. 8, n. 1, 2013, 113-117
doi: 10.5132/eec.2013.01.016

EEC

Avaliação da toxicidade crônica de piraclostrobin, epoxiconazol e sua mistura em *Daphnia similis*

E.B. PRESTES¹; C.M. JONSSON¹; V.L.S.S. CASTRO¹ & C.C.M. PARAÍBA²

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brasil.

² Departamento de Estatística, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

(Received May 20, 2012; Accept April 28, 2013)

Resumo

O presente trabalho avaliou o efeito toxicológico de formulações fungicidas à base de piraclostrobin e epoxiconazol, isoladamente e em formulação conjugada sobre *Daphnia similis* por 21 dias, através da determinação da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) de cada uma das formulações. Em relação à mortalidade de *D. similis*, foram encontrados valores CENO de 0,098 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a formulação à base de piraclostrobin; 1,324 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a formulação à base de epoxiconazol e 0,341 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a formulação conjugada. Em relação à alteração na relação neonatos/adulto foram encontrados valores CENO de 0,579 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a formulação à base de piraclostrobin; 3,599 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a formulação à base de epoxiconazol e 0,623 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a formulação conjugada. Das três formulações utilizadas, o piraclostrobin isoladamente mostrou-se o mais tóxico para os organismos estudados.

Palavras-chave: *Daphnia similis*, epoxiconazol, piraclostrobin, toxicidade.

Abstract

Chronic toxicity evaluation of formulations based on pyraclostrobin, epoxiconazole and its combination to *Daphnia similis*

The current paper investigates toxicological effects of fungicidal formulations based on pyraclostrobin, epoxiconazole and its combined formulation to *Daphnia similis* through determination of No Observed Effect Concentration (NOEC) from each formulation. Regarding *D. similis* mortality, NOEC values found were 0.098 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1.324 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.341 $\mu\text{g L}^{-1}$ for pyraclostrobin, epoxiconazole and combined formulation, respectively. Regarding newborn/adult ratio, NOEC values found were 0.579 $\mu\text{g L}^{-1}$, 3.599 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.623 $\mu\text{g L}^{-1}$ for pyraclostrobin, epoxiconazole and combined formulation, respectively.

Pyraclostrobin isolatedly was the most toxic chemical among analyzed formulations.

Keywords: *Daphnia similis*, epoxiconazole, pyraclostrobin, toxicity.

INTRODUÇÃO

Atualmente o uso combinado de dois ou mais fungicidas na agricultura vem sendo amplamente realizado buscando-se o aumento do espectro de ação dos fungicidas para o controle de enfermidades que ocorram simultaneamente nos cultivos,

o melhor aproveitamento do potencial sinérgico entre os diferentes agentes e o retardo da ocorrência de resistência fúngica, entre outros fatores (Gisi, 1996). No mercado brasileiro são encontradas várias formulações combinadas de fungicidas, entre estas a associação de triazóis como o epoxiconazol e estrobilurinas como o piraclostrobin.

*Corresponding author: C.M. Jonsson, e-mail: jonsson@cnpmembrapa.br

Estes dois princípios ativos encontram-se disponíveis em formulações isoladas ou conjugadas entre si.

A despeito do seu papel como ferramenta para o aumento da produtividade dos cultivos, os fungicidas apresentam o revés da contaminação de água e solos das áreas de cultivo e adjacências, podendo levar ao comprometimento da fauna e flora (Battaglin *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2009). Apesar de serem encontrados na literatura trabalhos relativos aos efeitos ecotoxicológicos dos triazóis sobre organismos aquáticos, são poucos os trabalhos sobre as estrobilurinas e sua combinação com outras substâncias.

A ação dos triazóis decorre da inibição do esteroide 14 α -demetilase (codificado pelo gene CYP51) em bolores e leveduras, bloqueando a biossíntese do ergosterol, componente essencial das membranas celulares destes organismos (Zarn *et al.*, 2003). Já as estrobilurinas agem inibindo a respiração mitocondrial pela ligação ao citocromo b, bloqueando assim a geração de ATP (Bartlett *et al.*, 2001).

O microcrustáceo planctônico *Daphnia* sp. é utilizado na avaliação de risco e monitoramento de poluentes em meio aquático, sendo recomendado o seu uso por órgãos nacionais e internacionais (European Commission, 2002; OECD, 2008; ABNT, 2009). Deste modo, o presente trabalho avaliou o efeito toxicológico de formulações fungicidas à base de piraclostrobin, epoxiconazol e sua mistura sobre *D. similis* por 21 dias, através da determinação da Concentração de Efeito Não Observado de cada uma das formulações.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas formulações de fungicidas à base de piraclostrobin (25,0% m/v), epoxiconazol (12,5% m/v) e de sua mistura (piraclostrobin a 13,3% m/v e epoxiconazol a 5,0% m/v) oriundas de apresentações comerciais disponíveis no mercado. Como organismo-teste utilizou-se *D. similis* com idade inferior a 24 horas. O invertebrado foi previamente cultivado em aquários de 40 x 25 x 15 cm, com água declorinizada apresentando pH 7,8; dureza total 111,0 mg de CaCO₃ L⁻¹ e condutividade 0,38 mS cm⁻¹. O cultivo foi realizado em sala climatizada sob temperatura controlada a 20±2°C e luminosidade de 1.000 lux, sendo os organismos alimentados com algas clorofíceas unicelulares das espécies *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella pyrenoidosa*.

Seis neonatos de *D. similis* foram alocados em recipientes de vidro medindo 5 cm de altura x 5 cm de raio, contendo água declorinizada e mantidos em sala climatizada sob as mesmas condições da fase de cultivo. Este sistema constituiu-se na unidade experimental do trabalho. Em cada repetição do teste (num total de quatro), unidades experimentais foram expostas por 21 dias ao piraclostrobin nas concentrações de 0,22; 0,67; 2,20; 6,00 e 18,00 $\mu\text{g L}^{-1}$; ao epoxiconazol nas concentrações de 2,28; 5,70; 14,24; 35,60 e 89,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ e à mistura dos fungicidas piraclostrobin (13,3% m/v) e epoxiconazol (5% m/v) nas concentrações de 0,59; 1,47; 3,68; 9,20 e 23,00 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para cada concentração de exposição foi alocada uma unidade

experimental e para o grupo-controle duas unidades. A definição das concentrações a serem utilizadas baseou-se em estudos prévios de toxicidade aguda, onde os valores de concentração de inibição média da mobilidade num período de 48 horas (CI_{50-48 h}) resultaram em 18,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o piraclostrobin, 89,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o epoxiconazol e 23,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a mistura (Prestes *et al.*, 2010). A renovação das soluções com os fungicidas dos grupos-teste e da água dos grupos-controle foi realizada três vezes por semana, sendo registrado a cada renovação o número de adultos, o número de organismos jovens gerados e a taxa de reprodução (nº de jovens/adulto) em cada recipiente.

Os dados foram analisados estatisticamente, onde as médias das taxas de reprodução (nº de neonatos/adulto/dia) dos tratamentos avaliados foram comparadas às médias de cada um dos controles aplicando-se a análise estatística através da abordagem *Bootstrap* utilizando-se do *software* estatístico “r” versão 2.10 e do pacote “drc” (Ritz & Streibig, 2005). O método *Bootstrap* não-paramétrico é um procedimento computacional de inferência estatística que se utiliza de um processo de reamostragem dos dados usando sua distribuição empírica, podendo ser aplicado para encontrar estimadores estatísticos de diferentes medidas de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos fungicidas e sua combinação testadas, observa-se nas Tabelas de 1 a 3 e Figuras de 1 a 3 o aumento da mortalidade e decréscimo da natalidade dos grupos quando da exposição a concentrações crescentes dos fungicidas.

O piraclostrobin apresentou a maior toxicidade crônica à *D. similis* entre os fungicidas avaliados, seguido pela mistura piraclostrobin + epoxiconazol e por último o epoxiconazol, conforme Tabela 4.

O presente estudo revelou um valor CENO de piraclostrobin para *Daphnia* sp. menor que valores encontrados na literatura, como o relatório do governo australiano avaliando o piraclostrobin de uma apresentação comercial o qual registra o valor CENO de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto no presente trabalho foi determinado 0,579 $\mu\text{g L}^{-1}$ para efeitos na relação neonatos/adulto. O mesmo relatório classifica o fungicida como de “muito alta toxicidade” (APVMA, 2003).

Bartlett *et al.* (2002) em seu trabalho de revisão das estrobilurinas, fornece um quadro comparativo dos valores de CENO para *D. magna* quando expostos aos diferentes compostos desta família de fungicidas, cujos valores e a comparação com os determinados no presente trabalho e outros podem ser observado na Tabela 5.

A Autoridade Australiana de Pesticidas em seu relatório sobre o produto Cabrio® (piraclostrobin), descreve o cálculo da “Concentração Ambiental Estimada” (EEC) para este fungicida, onde ao se considerar uma área de campo alagado por lâmina de 15 cm de água e a aspersão do agente em uma taxa de 150 g de ingrediente ativo por hectare (conforme indicação de produto comercial) geraria uma EEC de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ do agente no corpo d’água (APVMA, 2003). Tal valor representa mais de 100 vezes o valor CENO encontrado para a *Daphnia*

Tabela 1 - Efeitos das diversas concentrações de piraclostrobin sobre a sobrevivência e natalidade de *D. similis* em teste de toxicidade crônica por 21 dias.

Concentração do fungicida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Indivíduos parentais	Sobreviventes	Neonatos
Controle	24	22	722
0,22	24	2	129
0,67	24	0	125
2,20	24	0	54
6,00	24	0	24
18,00	24	0	0

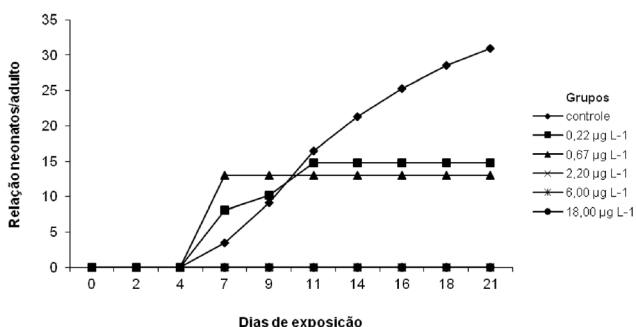


Figura 1: Relação neonatos/adulto de *D. similis* exposta a diversas concentrações de piraclostrobin durante 21 dias. Os pontos representam a média acumulada de quatro réplicas para cada período de avaliação.

Tabela 2: Efeitos das diversas concentrações de epoxiconazol sobre a sobrevivência e natalidade de *D. similis* em teste de toxicidade crônica por 21 dias.

Concentração do fungicida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Indivíduos parentais	Sobreviventes	Neonatos
Controle	24	22	591
2,28	24	4	89
5,70	24	2	84
14,24	24	0	78
35,60	24	0	72
89,00	24	0	0

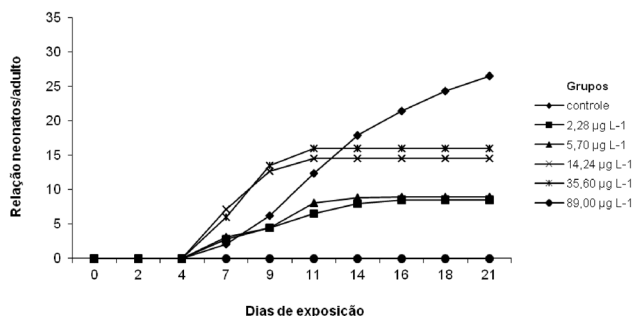


Figura 2 - Relação neonatos/adulto de *D. similis* exposta a diversas concentrações de epoxiconazol durante 21 dias. Os pontos representam a média acumulada de quatro réplicas para cada período de avaliação.

Tabela 3: Efeitos das diversas concentrações da mistura (piraclostrobin + epoxiconazol) sobre a sobrevivência e natalidade de *D. similis* em teste de toxicidade crônica por 21 dias.

Concentração do fungicida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Indivíduos parentais	Sobreviventes	Neonatos
Controle	24	22	628
0,59	24	3	29
1,47	24	0	20
3,68	24	0	18
9,20	24	0	3
23,00	24	0	0

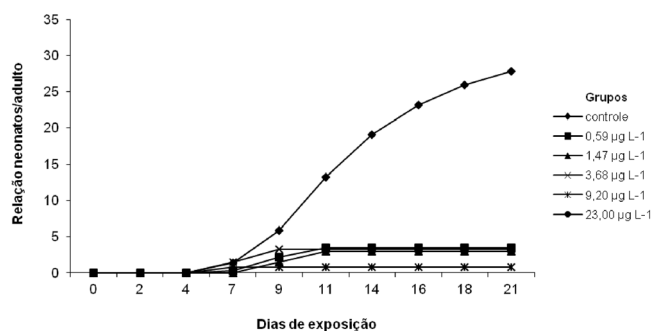


Figura 3: Relação neonatos/adulto de *D. similis* exposta a diversas concentrações da mistura (piraclostrobin + epoxiconazol) durante 21 dias. Os pontos representam a média acumulada de quatro réplicas para cada período de avaliação.

Tabela 4: Valores de Concentração de Efeito Não-Observado (CENO) para o piraclostrobin, epoxiconazol e mistura para a mortalidade e a relação neonatos/adulto de *D. similis*.

Fungicida	Efeito	CENO ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Piraclostrobin	Mortalidade de <i>D. similis</i>	0,098
	Relação neonatos/adulto	0,579
Epoxiconazol	Mortalidade de <i>D. similis</i>	1,324
	Relação neonatos/adulto	3,599
Mistura (Piraclostrobin + Epoxiconazol)	Mortalidade de <i>D. similis</i>	0,341
	Relação neonatos/adulto	0,623

Tabela 5: Valores de Concentração de Efeito Não-Observado (CENO) crônico de fungicidas da classe das estrobilurinas sobre *D. magna*.

Fungicida	CENO (<i>D. magna</i> , em $\mu\text{g L}^{-1}$)
Azoxistrobin	44*
Kresoxim-metil	32*
Trifloxistrobin	2,8*
Picoxistrobin	8*
Piraclostrobin	4**; 0,098; 0,579***

* Bartlett et al. (2002). ** APVMA (2003). *** Valor obtido no presente trabalho para efeitos em mortalidade de adultos; efeitos na relação neonato/adulto.

sp. no presente trabalho. Apesar de tratar-se de uma estimativa teórica, considerando-se uma aplicação direta do agente sobre a água e onde os mecanismos naturais de degradação do fungicida no meio-ambiente não são considerados (degradação

aeróbica, fotólise, hidrólise, etc.), o dado permite estimar o impacto da contaminação de corpos aquáticos por este fungicida, em especial quando consideramos que as grandes

áreas de plantio comercial muitas vezes se situam próximas a fontes hídricas de superfície a fins de irrigação, facilitando a ocorrência de contaminação destes mananciais através do escoamento superficial, derivação atmosférica, etc.

O epoxiconazol apresentou a menor toxicidade dentre os agentes químicos testados com CENO equivalente a 1,324 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 3,599 $\mu\text{g L}^{-1}$, para a mortalidade e para a alteração na relação neonatos/adulto. Um relatório do governo inglês reportando a análise do fungicida, relata um valor de CENO de 630 $\mu\text{g L}^{-1}$ (21 dias) baseado na mortalidade de neonatos e na relação neonatos/adultos (DEFRA, 1999). Vários fatores podem ser considerados para se explicar a divergência entre tal resultado e aquele encontrado no presente trabalho, como a diferença de sensibilidade entre os diferentes clones de *Daphnia* conforme relatado por Baird *et al.* (1990), características físico-químicas da água utilizada e lotes de fungicida, entre outros. Entretanto, dada a ordem de grandeza da diferença entre os valores e a escassez de outros trabalhos similares, estudos posteriores são necessários para a melhor compreensão dos fatores implicados nesta ocorrência.

Estudo realizado por Mendes *et al.* (2011) em rio no Estado de Santa Catarina detectou um valor máximo de Metconazol de 4,98 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto na Suíça, análise de águas de efluente pós-tratamento realizada por Kahle *et al.* (2008) revelaram resultados de no máximo 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ de propiconazol. Nos dois casos, apesar das diferentes origens das amostras e das condições macroambientais nos quais elas estão inseridas, a contaminação faz-se presente em ambas as situações em maior ou menor quantidade, indicando que as regulamentações e práticas vigentes para o uso de fungicidas nas mais diversas situações não vem obtendo sucesso em evitar de maneira efetiva o acesso destes contaminantes aos mananciais locais. Deve-se considerar ainda a atenção especial que os azóis merecem em relação à toxicidade, pois seu mecanismo de ação (inibição da esteroidogênese através da ligação ao CYP51) possui uma baixa especificidade, tanto quando consideramos a relação ao CYP51 fúngico e não-fúngico, quanto a outras enzimas do complexo citocromo P-450, apresentando deste modo um potencial risco de ação sobre o sistema endócrino da fauna aquática (Kahle *et al.*, 2008).

Em relação à formulação combinada de piraclostrobin + epoxiconazol, os resultados do presente trabalho mostram que o composto apresenta uma toxicidade intermediária à *D. similis* quando comparado aos dois fungicidas isolados, sugerindo que a utilização conjunta dos mesmos não potencializaria, de maneira geral, o seu efeito tóxico. Entretanto, Prestes *et al.* (2011) em trabalho com algas observaram que a formulação combinada dos mesmos fungicidas em concentrações semelhantes exerceu um efeito tóxico 13,6 vezes mais efetivo que os agentes em separado sobre esta espécie. A situação ilustra a necessidade de uma visão abrangente quando da avaliação de toxicidade de agentes químicos sobre espécies não-alvo, pois levando-se em conta a complexa biota aquática presente no ambiente natural e os diversos graus de sensibilidade entre as espécies, grupos pouco impactadas pelo agente podem ser diretamente dependentes de outros que possuem elevada sensibilidade ao mesmo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro ao estudo.

REFERÊNCIAS

- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2009, NBR 12713 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera), 23p. ABNT, Rio de Janeiro.
- APVMA, AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2003, Evaluation of the new active Pyraclostrobin in the product Cabrio fungicide. APVMA, Canberra.
- BAIRD, D. J.; BARBER, I.; CALOW, P., 1990, Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects. *Func. Ecol.*, 4: 399-407. <http://dx.doi.org/10.2307/2389602>.
- BARTLETT, D. W., CLOUGH, J. M., GODFREY, C. R. A., GODWIN, J. R., HALL, A. A., HEANEY, S. P. & MAUND, S. J., 2001, Understanding the strobilurin fungicides. *Pestic. Outlook*, 4: 143-148. <http://dx.doi.org/10.1039/b106300f>.
- BATTAGLIN, A., W., SANDSTROM, M. W., KUIVILA, K. M., KOLPIN, D. N. & MEYER, M. T., 2011, Occurrence of azoxystrobin, propiconazole and selected other fungicides in US streams, 2005-2006. *Water, Air, Soil Pollut.*, 218: 307-322. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-010-0643-2>.
- DEFRA, DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS, 1999, The environmental fate and behaviour and ecotoxicity of epoxiconazole. DEFRA, York.
- EUROPEAN COMMISSION, 2002, *Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology*, rev. 4. European Commission, Brussels.
- GISI, U. 1996, Synergistic interaction of fungicides in mixtures. *Phytopathology*, 86: 1273-1279.
- KAHLE, M., BUERGE, I. J., HAUSER, A., MÜLLER, M. D., POIGER, T., 2008, Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environ. Sci. Technol.*, 42: 7193-7200. <http://dx.doi.org/10.1021/es8009309>.
- MENDES, B. G., BUDZIAK, D., STOLBERG, J., PEIXER, Z. I., DALMARCO J. B., SIMIONATTO, E. L., PEDROSA, R. C., FELIPE, K. B., OGAWA, J., PEGORARO, C., SCHEFFER, L., BESEN, M. R., OLIVEIRA, L. J. G. G. DE, GEREMIAS, R., 2011, Estudo da qualidade das águas do Rio Marombas (SC/Brasil), utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios. *Rev. Ciências Ambientais*. 5:43-58.
- OECD, ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2008, *Guideline for the testing of chemicals: Daphnia magna reproduction test*. OECD, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264077997-en>.
- PRESTES, E. B., PAULA, V. J. DE, SANTOS, F., JONSSON, C. M., CASTRO, V. L. S. S. DE, 2010, Estudo sobre a ação conjunta dos fungicidas epoxiconazol e piraclostrobina na mobilidade do microcrustáceo *Daphnia similis*. In: *Resumos do XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*. Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, Bombinhas.
- PRESTES, E. B., JONSSON, C. M., CASTRO, V. L. S. S. DE, 2011, Avaliação da toxicidade de piraclostrobin, epoxiconazol e sua mistura em alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 21: 39-46.
- RITZ, C. & STREIBIG, J. C., 2005, Bioassay Analysis using R. J.

- Statist. Software*, 12: 1-22.
- SILVA, D. R. O., AVILA, L. A., AGOSTINETTO, D. & DAL MAGRO, T., 2009, Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. *Ciência Rural*, 39: 2383-2389. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000900001>.
- ZARN, A. J., BRÜSCHWEILER, B. J., SCHLATTER, J. R., 2003, Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 111: 255-261. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.5785>.