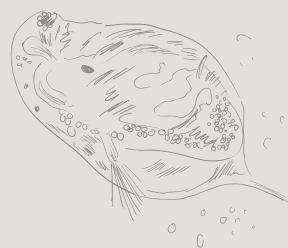


# FUNGICIDAS NOS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS: EVIDÊNCIAS DO PROJETO FUNG-EYE



BRUNO B. CASTRO<sup>1,2\*</sup>, CLÁUDIA MACHADO<sup>1,2</sup>, ANA RITA PIMENTÃO<sup>1,2</sup>, ANA PATRÍCIA CUÇO<sup>1,2</sup>

\* brunocastro@bio.uminho.pt

1 Departamento de Biologia & Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), Escola de Ciências, Universidade do Minho  
2 Instituto de Ciência e Inovação para a Bio-Sustentabilidade (IB-S), Escola de Ciências, Universidade do Minho

## RESUMO

O uso de pesticidas está longe de ser sustentável, apesar dos esforços legislativos e das políticas ambiciosas da União Europeia (UE). De entre as várias classes de pesticidas, os fungicidas são a mais usada na Europa, e a sua deteção em águas superficiais é frequente. No entanto, a informação sobre os efeitos ecológicos de fungicidas nos ecossistemas aquáticos é ainda insuficiente, fruto de um certo grau de enviesamento na literatura científica. Este artigo pretende reforçar a consciencialização para a problemática dos impactos dos fungicidas nas teias alimentares aquáticas e demonstrar – com recurso a estatísticas oficiais e dados gerados pelo projeto FunG-Eye – que ainda estamos longe de um uso sustentável. Os dados de vendas e utilização de pesticidas (ou produtos fitofarmacêuticos) revelaram que os fungicidas são fundamentais na produção agrícola no espaço europeu, e que esta dependência é mais pronunciada (relativamente a herbicidas e inseticidas) do que noutras regiões do mundo. Foram observadas assimetrias entre países europeus,

sendo de destacar a região sob influência Mediterrânica (incluindo Portugal), que apresenta uma dependência marcada desta classe de pesticidas, recorrendo sobretudo a formulações à base de cobre e enxofre em detrimento de compostos orgânicos de síntese. Os fungos e oomicetos aquáticos são potenciais alvos dos fungicidas que atingem os ecossistemas aquáticos, e os resultados do projeto FunG-Eye demonstraram que algumas substâncias ativas (nomeadamente os azóis) podem ser perigosas para os processos e interações tróficas onde estes microrganismos intervêm. Atendendo às evidências científicas de que os agroquímicos têm contribuído para o declínio da biodiversidade aquática, este é um momento decisivo para o fomento de modos de produção agrícola mais sustentáveis e alinhados com as agendas da UE e das Nações Unidas (ONU) para 2030. O projeto FunG-Eye ambiciona contribuir para os alicerces científicos dessa mudança.

## PALAVRAS-CHAVE

Ecossistemas dulçaquícolas, interações tróficas, modelos experimentais, pesticidas, poluição aquática.

**CITAÇÃO RECOMENDADA** Castro BB, Machado C, Pimentão AR & Cuço AP (2021). Fungicidas nos ecossistemas aquáticos: evidências do projeto FunG-Eye. *Lucanus* – Revista de Ambiente e Sociedade, Volume V, Páginas 124-145.

## ABSTRACT

The use of pesticides is far from being sustainable, despite European Union's legislative efforts and ambitious policy. Fungicides are the most used pesticide class in Europe and their detection in superficial waters is frequent. However, because of several biases in scientific knowledge, information about their ecological effects in aquatic ecosystems is still insufficient. This paper's aim is to promote awareness on the problematic impacts of fungicides in aquatic food webs and to demonstrate – based on official statistics and data generated by the project FunG-Eye – that we are still far from finding a sustainable use for them. Pesticide use and sales data revealed that fungicides are fundamental in food production in Europe, and this dependency is more pronounced (relatively to herbicides and insecticides) than in other regions of the world. Asymmetries were found across European countries; regions under Mediterranean influence (including Portugal) are an interesting

case study, as they are highly dependent on copper- or sulphur-based formulations and less on synthetic organic fungicides. Aquatic fungi and oomycetes are potential targets of fungicides that reach aquatic ecosystems, and results from project FunG-Eye demonstrated that some active substances (namely azoles) can be hazardous to trophic interactions and processes where these microbes intervene. Considering the scientific evidence that agrochemicals are contributing to the decline of freshwater biodiversity, this is a decisive moment to promote a shift towards food production modes that are more sustainable and aligned with the EU and UN agendas for 2030. Project FunG-Eye aspires to contribute to the scientific underpinnings of this change.

## KEYWORDS

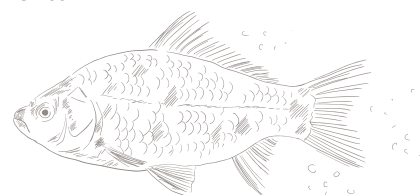
Aquatic pollution, experimental models, freshwater ecosystems, pesticides, trophic interactions.

# 1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos químicos sintéticos está longe de ser sustentável, em particular no caso dos pesticidas usados na produção agrícola (Kiss 2019). As necessidades crescentes da população humana traduziram-se no aumento do uso de substâncias químicas na produção de alimentos (Bommarco *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014), cenário agravado com as mudanças climáticas globais (Balbus *et al.* 2013). Alguns contaminantes libertados pelas atividades humanas circulam globalmente pelos compartimentos ambientais (ar, água, solo) e causam efeitos por vezes subtis (a baixas concentrações) nos ecossistemas e na saúde humana (Schwarzenbach *et al.* 2009, 2010). A agricultura é uma importante fonte destas substâncias químicas, sobretudo pela dependência de fertilizantes e pesticidas para melhorar o rendimento da produção agrícola (Liu *et al.* 2014), e os ecossistemas aquáticos

são particularmente vulneráveis a estes poluentes. Efetivamente, uma larga fração destes agroquímicos falha o alvo de aplicação (plantas em cultivo ou produtos armazenados) ou é posteriormente transportada (por deriva aérea, erosão, escorrência e drenagem), atingindo os cursos de água (Arias-Estévez *et al.* 2008; Cerejeira *et al.* 2003; de Souza *et al.* 2020). Deste modo, os organismos aquáticos enfrentam a ameaça da bioacumulação e biomagnificação destas substâncias, bem como outros efeitos biológicos, o que compromete a qualidade da água enquanto suporte de biodiversidade e recurso para os humanos (Malaj *et al.* 2014; de Souza *et al.* 2020). Recentemente, a sensibilidade dos cidadãos para os potenciais impactos dos pesticidas no ambiente ou na saúde humana tem aumentado, alimentada pelos media, pelos relatórios oficiais sobre a presença de resíduos de pesticidas nos alimentos (EFSA *et al.* 2020), ou por episódios esporádicos como a recente controvérsia sobre o glifosato (Kudsk & Mathiassen 2020).

Ciente da dependência dos pesticidas na produção alimentar e suas implicações ambientais, a União Europeia tem vindo a definir uma agenda para atingir um uso mais sustentável destas substâncias. O comércio de novos produtos “fitofarmacêuticos” à escala europeia tornou-se mais apertado (via Regulamento 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de outubro), ao mesmo tempo que foi implementado um quadro de ação comunitária para uma menor dependência dos pesticidas (Diretiva 2009/128/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de outubro). Esta diretiva traduziu-se, a nível nacional<sup>1</sup>, em dois instrumentos importantes: (i) a Lei n.º 26/2013, que regula as atividades de distribuição, venda e aplicação de pesticidas, e que define procedimentos de monitorização da sua aplicação; (ii) o Plano de Ação Nacional para o Uso Sustentável dos Produtos Fitofarmacêuticos (Portaria n.º 304/2013 e Portaria n.º 82/2019), que inclui medidas de formação e sensibilização dos profissionais do setor (técnicos, operadores de venda e aplicadores), de promoção de práticas de minimização de risco, e de fomento de sistemas de produção mais sustentáveis (DGAV 2018). Em conjunto, este enquadramento legislativo pretende implementar uma estratégia que se traduza na redução dos riscos e impactos do uso de pesticidas na saúde humana e no ambiente, particularmente nos ecossistemas aquáticos (pela sua especial vulnerabilidade a estas substâncias). Ambiciosamente, este novo paradigma define a sustentabilidade ambiental e a segurança alimentar como os pilares da produção de alimentos na Europa (no âmbito das ações previstas no Pacto Ecológico Europeu<sup>2</sup>), num claro alinhamento com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU<sup>3</sup>.



1 <https://www.dgav.pt/medicamentos/conteudo/produtos-fitofarmaceticos/>

2 [https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal/protecting-environment-and-oceans-green-deal\\_pt](https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal/protecting-environment-and-oceans-green-deal_pt)

3 <https://sdgs.un.org/goals>

Apesar dos esforços políticos e legislativos no sentido da transição para práticas mais sustentáveis, a diminuição da dependência dos pesticidas é atualmente ainda incipiente, o que está patente na quantidade de formulações e substâncias ativas disponíveis, bem como na sua magnitude e frequência de aplicação. A quantidade total de pesticidas vendida na UE-27 tem permanecido estável (entre 2011 e 2018), próximo de 360 000 toneladas/ano (EUROSTAT 2019), com um total de 456 substâncias ativas aprovadas para uso em formulações comerciais<sup>4</sup>. De entre todas as classes, os fungicidas são o grupo mais representado em termos de substâncias ativas (120) e de vendas anuais (ca. 160 000 toneladas em 2019, considerando conjuntamente fungicidas e bactericidas). No sul da Europa, a vitivinicultura contribui substancialmente para estes números (Fraga *et al.* 2017), sendo que existem atualmente quase 300 formulações comerciais de fungicidas para aplicação em culturas de vinha em Portugal, em combinações de mais de 60 substâncias ativas<sup>5</sup>. A cultura da vinha exhibe uma dependência marcada da aplicação de fungicidas ao longo das diferentes fases da cultura para prevenir e combater oídios, míldios e podridões causadas por fungos e oomicetos no lenho, folha ou fruto. Em resultado da aplicação preventiva e frequente de fungicidas, como no caso da vinha e outras culturas, é comum encontrar resíduos destas substâncias nos ecossistemas aquáticos (Bereswill *et al.* 2012; Cerejeira *et al.* 2003; Kahle *et al.* 2008). Contudo, os impactos destas substâncias podem ser subtis e passar despercebidos (Zubrod *et al.* 2015), havendo ainda importantes lacunas de conhecimento devido a algum enviesamento na informação disponível sobre os seus efeitos ecológicos (Ittner *et al.* 2018; Zubrod *et al.* 2019).

## 1.1. IMPACTOS ECOLÓGICOS DE FUNGICIDAS NOS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

**A** pesar dos fungicidas serem a classe de pesticidas mais usada na Europa e a sua deteção ser frequente em águas superficiais, a informação sobre os seus efeitos ecológicos nos ecossistemas aquáticos é ainda insuficiente. Por um lado, as lacunas de conhecimento devem-se à maior visibilidade dada aos inseticidas e herbicidas (Zubrod *et al.* 2019), pela suspeita de efeitos ambientais mais drásticos ou pelo seu potencial carcinogénico e teratogénico. As recentes controvérsias da proibição de três neonicotinóides (Bass & Field 2018; Cressey 2017) e dos movimentos populares anti-glifosato (Kudsk &

<sup>4</sup> [https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en)

<sup>5</sup> <https://sifito.dgav.pt/divulgacao/produtos>

Mathiassen 2020) ilustram bem como os europeus têm sido sensíveis a suspeitas de impactos ambientais ou na saúde humana por parte de inseticidas e herbicidas, respetivamente. Por outro lado, os instrumentos padronizados de avaliação do risco de pesticidas incluem testes laboratoriais com organismos aquáticos, como peixes ou invertebrados, mas tradicionalmente não incluem fungos ou oomicetos aquáticos, que são os alvos mais prováveis da ação de substâncias fungicidas que atinjam os sistemas aquáticos (Ittner *et al.* 2018; Zubrod *et al.* 2019). Estes organismos estão intimamente relacionados com animais, plantas e bactérias, e os vários elos da teia alimentar podem ser afetados pela ação dos fungicidas, algo que também não é considerado no processo de análise de risco de pesticidas (Topping *et al.* 2020).

Os fungos aquáticos estão presentes em todo o tipo de massas de água, desempenhando um papel importante na reciclagem de matéria orgânica e no fluxo de energia nas teias alimentares através de vários processos (Dighton 2016; Grossart *et al.* 2019). Habitualmente, os fungos costumam estar associados a outros organismos, revelando-se nodos vitais numa rede complexa de interações. Os fungos aquáticos decompositores (hifomicetos, Figura 1), por exemplo, vivem associados à matéria orgânica em decomposição (ex.: folhas, galhos ou animais mortos), utilizando as suas enzimas extracelulares para degradar alguns compostos altamente recalcitrantes (Duarte *et al.* 2006; Pascoal *et al.* 2005). Os invertebrados detritívoros dependem deste condicionamento prévio (Graça 2001; Pascoal *et al.* 2005), pois alimentam-se do material vegetal semidecomposto e do biofilme associado (fungos e outros microrganismos). Também existem fungos aquáticos que vivem intimamente ligados a outros organismos, formando associações mutuamente benéficas (líquenes e micorrizas) ou causando doenças (fungos parasitas,



**FIGURA 1** A decomposição nos ecossistemas aquáticos é mediada por fungos decompositores (hifomicetos) e invertebrados detritívoros. Na imagem (A), vê-se uma larva de inseto (tricóptero) a alimentar-se do biofilme associado a uma folha colonizada por fungos aquáticos (em ampliação). Esta interação é a base da teia alimentar em sistemas ribeirinhos rodeados de vegetação (B). Estes organismos podem ser amostrados no campo (C) e transportados para o laboratório para a realização de experiências em microcosmos (D).



**FIGURA 2** A doença é uma componente importante dos ecossistemas aquáticos, contribuindo para os fluxos de energia na teia alimentar e modulando a dinâmica das populações de hospedeiro e parasita/patógeno. Na imagem (A), vê-se dois exemplares de um pequeno crustáceo (hospedeiro), sendo que o da direita é saudável e o da esquerda está infetado com um fungo parasita (em ampliação). Esta relação trófica é comum em sistemas lacustres, como lagos e albufeiras (B). Estes organismos podem ser amostrados no campo (C) e transportados para o laboratório para a realização de experiências em microcosmos (D).

Figura 2). Apesar de menos conhecidos, estes fungos crípticos podem atingir uma biomassa considerável e contribuir para os fluxos de energia nas teias tróficas (Dighton 2016) como itens alimentares, facilitadores da captação de nutrientes pelos organismos a que estão associados, ou moduladores das populações de hospedeiros e sua diversidade genética.

A literatura científica tem dedicado atenção modesta aos efeitos dos fungicidas nas comunidades de fungos aquáticos. A maior parte dos estudos publicados tem-se focado nas comunidades de hifomicetos (fungos decompositores) e na teia alimentar associada, demonstrando que algumas substâncias ativas conseguem diminuir drasticamente a sua reprodução (Dimitrov *et al.* 2014; Pimentão *et al.* 2020) e biomassa (Abelho *et al.* 2015; Artigas *et al.* 2012), verificando-se em alguns casos um comprometimento das taxas de decomposição de material vegetal (Artigas *et al.* 2012). Embora a maior parte destes efeitos tenha sido observada em condições controladas (manipulação experimental), há evidências de alterações estruturais e na biomassa da comunidade de hifomicetos, associadas a uma redução da decomposição, em rios poluídos com fungicidas em regiões vinícolas (Fernández *et al.* 2015). As evidências acumuladas sugerem que o atual processo de análise de risco de substâncias fungicidas não protege adequadamente as comunidades de fungos aquáticos e os processos onde estes intervêm (Ittner *et al.* 2018; Zubrod *et al.* 2015, 2019). Contudo, existe consideravelmente menos literatura sobre os efeitos ecológicos de fungicidas em fungos parasitas (Cuco *et al.* 2017a; Hanlon *et al.* 2012) ou outros simbiosiontes (Wilson *et al.* 2014). É consensual que escasseia informação sobre os efeitos nestes fungos menos estudados e sobre as consequências ecológicas em termos de fluxos de energia, reciclagem de matéria, e dispersão de doenças nos ecossistemas aquáticos.

## 1.2. O PROJETO FUNG-EYE

No seguimento das lacunas aqui apontadas, surgiu o conceito do projeto FunG-Eye, que pretende olhar para a problemática da contaminação por fungicidas sintéticos nos ecossistemas aquáticos utilizando modelos experimentais, envolvendo fungos aquáticos e suas interações com outros organismos. Este projeto é liderado por uma equipa de investigadores do Centro de Biologia Molecular e Ambiental (Universidade do Minho), e inclui a colaboração de equipas do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (Universidade do Porto) e do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (Universidade de Aveiro).

O projeto FunG-Eye tem como objetivos incrementar o conhecimento acerca dos riscos ecológicos associados a alguns fungicidas de uso comum e contribuir com ferramentas analíticas inovadoras para uma deteção mais eficaz destas substâncias. O segundo objetivo, que contempla o desenvolvimento de uma solução biotecnológica baseada numa levedura modelo, encontra-se à margem do âmbito deste artigo e não será aqui apresentado. O primeiro objetivo envolve uma abordagem com modelos biológicos experimentais, selecionados como representativos dos ecossistemas aquáticos de água corrente (sobretudo pequenos ribeiros, comuns no mosaico da paisagem agrícola) e de água parada (charcos e albufeiras, onde o maior tempo de residência da água pode acarretar a acumulação de contaminantes). No caso dos ribeiros, a principal fonte de energia disponível reside no material vegetal (sobretudo folhas da vegetação ribeirinha) que entra no rio, cujo processamento requer a (inter)ação conjunta dos hifomicetos decompositores e dos invertebrados detritívoros (Figura 1). Este é um modelo com inúmeras vantagens, que permite manipular separadamente fungos e invertebrados, assim como realizar experiências controladas no campo ou no laboratório. No caso das albufeiras, o modelo escolhido recaiu num crustáceo (*Daphnia* spp.) que habita a coluna de água e que tem como inimigos naturais vários predadores e parasitas, entre os quais um fungo (levedura) causador de doença (que pode originar epidemias nas populações de *Daphnia*). No laboratório, este modelo permite total controlo do processo de transmissão e carga parasitária em experiências de infeção (Figura 2).

Estes sistemas experimentais envolvendo fungos aquáticos proporcionam uma oportunidade para estudar os efeitos dos fungicidas numa perspetiva multi-espécie e focada nas interações tróficas entre espécies, permitindo identificar potenciais consequências em termos das teias alimentares. Deste modo, consegue-se uma compreensão mais abrangente dos efeitos da poluição sobre processos ecológicos-chave que suportam serviços ecossistémicos insubstituíveis (ver Fu *et al.* 2013). Este é um empreendimento

necessário para alimentar avanços na análise de risco de pesticidas (Schäfer *et al.* 2019; Topping *et al.* 2020) e para proteger a biodiversidade dos ecossistemas de água doce da poluição aquática, em linha com a atual estratégia da União Europeia (ver acima). Aproveitando a crescente consciência dos cidadãos relativamente aos pesticidas e a evidência científica de que estes agroquímicos têm contribuído para o declínio da biodiversidade aquática (Malaj *et al.* 2014; Schäfer *et al.* 2019), este é um momento decisivo para o fomento de modos de produção mais sustentáveis; o projeto FunG-Eye ambiciona contribuir para os alicerces científicos dessa mudança.

## 1.3. OBJETIVOS

**N**a senda do projeto FunG-Eye, pretende-se apresentar a problemática da contaminação dos ecossistemas aquáticos por fungicidas, revendo alguns factos e números acerca da utilização de fungicidas no espaço europeu e dando a conhecer alguns dados sobre o potencial impacto destes contaminantes nas interações entre os fungos e outros organismos aquáticos. De modo a atingir este fim, foram traçados dois grandes objetivos para este trabalho: (i) rever as principais tendências no uso de fungicidas, à escala mundial, europeia e portuguesa; (ii) reportar alguns dos resultados do projeto FunG-Eye obtidos até agora com o modelo hospedeiro-parasita. O segundo objetivo está limitado ao modelo hospedeiro parasita (Figura 2) por ser um sistema para o qual há menos informação sobre o impacto dos fungicidas. Os resultados aqui reportados nunca foram apresentados na atual perspetiva e formato; não obstante, este artigo colige ou reanalisa dados utilizados em outras publicações (ou artigos em preparação), que abordam o assunto de forma mais aprofundada e que se destinam a uma audiência internacional especializada.



Os fungos aquáticos estão presentes em todo o tipo de massas de água, desempenhando um papel importante na reciclagem de matéria orgânica e no fluxo de energia nas teias alimentares através de vários processos.”



# 2 MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1. DADOS DE VENDAS E UTILIZAÇÃO DE FUNGICIDAS

O EUROSTAT (observatório da UE) compila os dados de vendas e uso dos pesticidas no espaço europeu através das agências governamentais competentes dos Estados Membros (no caso português é a Direção Geral de Agricultura e Veterinária). Estas bases de dados estão disponíveis publicamente<sup>6</sup>. A FAO (observatório para a alimentação e agricultura da ONU) compila bases de dados análogas com abrangência mundial, estando estas também disponíveis online<sup>7</sup>. Com recurso a estas bases de dados, foi efetuada uma pesquisa acerca das vendas e utilização/aplicação de fungicidas à escala mundial, europeia e nacional. De forma a permitir a comparação de regiões do globo ou países com dimensões e realidades distintas, foi calculada a fração que os fungicidas representam no total de vendas pesticidas de cada país ou região (quota) e os valores de utilização foram expressos por unidade de área de cultivo (kg/ha). Dado que os dados apresentam alguma descontinuidade, utilizou-se o ano de 2018 (compromisso entre informação recente e completa) para compreender quais as regiões do mundo mais dependentes de fungicidas na produção agrícola, e qual o perfil de utilização das principais classes químicas no espaço europeu (UE-28).



Foram traçados dois grandes objetivos para este trabalho: (i) rever as principais tendências no uso de fungicidas, à escala mundial, europeia e portuguesa; (ii) reportar alguns dos resultados do projeto FunG-Eye obtidos até agora com o modelo hospedeiro-parasita.”

6 <https://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/data/database>

7 <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RT> e <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>



## 2.2. MODELO EXPERIMENTAL HOSPEDEIRO-PARASITA

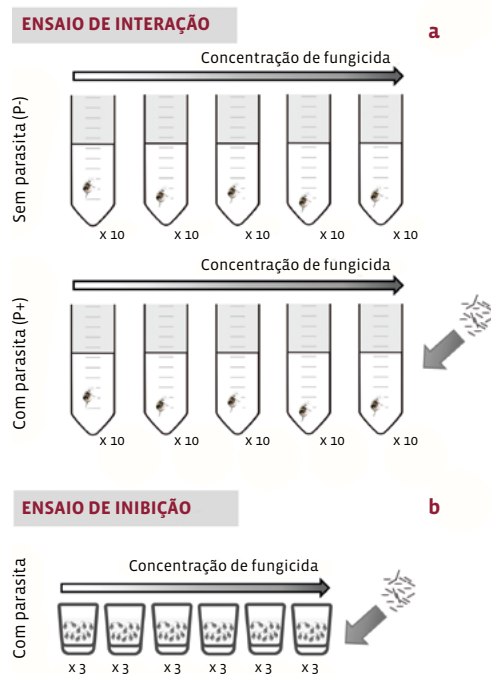
O modelo hospedeiro-parasita é composto pelas espécies *Daphnia magna* Straus, 1820 (hospedeiro) e *Metschnikowia bicuspidata* (Metschn.) T.Kamieński (parasita). Ambos foram isolados a partir de amostras colhidas no campo e mantidos no laboratório sob condições controladas sob a forma de linhagens monoclonais: *D. magna* clone E17:07 (Saebefeld *et al.* 2017) e *M. bicuspidata* estirpe AMME (Lohr *et al.* 2010). *Daphnia* é um género de microcrustáceo aquático que desempenha um papel chave nas teias alimentares de sistemas lacustres (água parada), e é comumente utilizado como modelo laboratorial devido à sua importância ecológica, ciclo de vida curto, reprodução assexuada, e requisitos simples de manutenção (Antunes & Castro 2017). As populações de *Daphnia* são hospedeiras de vários parasitas (Ebert 2005; Machado & Castro 2019), incluindo *M. bicuspidata* – uma levedura endoparasita que infeta e mata o hospedeiro ao fim de alguns dias.

No laboratório, *D. magna* foi mantida ciclicamente em culturas saudáveis e sincronizadas (fêmeas assexuadas da mesma idade) num meio de cultura semissintético (111 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 126 mg/L  $\text{NaHCO}_3$ , 110 mg/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7.45 mg/L KCl, 0.00150 mg/L  $\text{SeO}_2$ ), suplementado com um aditivo orgânico padronizado e vitaminas (Loureiro *et al.* 2011). A cada dois dias, o meio foi renovado e os animais alimentados com uma suspensão de microalgas (*Raphidocelis subcapitata*). Estas progenitoras saudáveis foram a fonte de animais juvenis (hospedeiros) para experiências. Em paralelo, foram mantidas culturas de *D. magna* infetadas com *M. bicuspidata*. Esta levedura parasita infeta a cavidade corporal do hospedeiro e aí se reproduz, produzindo centenas de milhar de esporos que são libertados aquando da morte do hospedeiro infetado. Os novos hospedeiros ficam infetados após alimentarem-se destes esporos (estádios de transmissão), o que assegura a perpetuação da infeção e um fornecimento contínuo de esporos do parasita para experiências (Figura 2).

As culturas e experiências foram mantidas numa sala com temperatura (20°C) e fotoperíodo (16 h luz: 8 h escuridão) controlado. Mais detalhes sobre este modelo experimental (Cuco *et al.* 2017a, 2020; Machado & Castro 2019), ou sobre a importância das relações hospedeiro-parasita (Machado & Castro 2019) e o significado ecológico da doença nos ecossistemas naturais (Hesse *et al.* 2012; Wolinska & King 2009; Wolinska & Spaak 2009) podem ser encontrados na literatura aqui citada.

## 2.3. ENSAIOS DE INTERAÇÃO FUNGICIDA × PARASITA

De forma a compreender a influência da contaminação por fungicidas e da doença, os efeitos individuais e conjuntos destes dois fatores foram estudados através de manipulações experimentais em laboratório. Resumidamente, juvenis (com menos de 24 h) da espécie hospedeira (*D. magna*) foram individualmente expostos a concentrações de fungicidas selecionados (incluindo um controlo negativo, sem fungicida) na ausência (P-) ou na presença (P+) do parasita (*M. bicuspidata*), de acordo com o desenho experimental apresentado na Figura 3a. Os organismos foram expostos ao fungicida desde o início (dia 0) até ao final (dia 21) do ensaio; o procedimento de infeção só foi efetuado ao dia 4 para minimizar os danos mecânicos causados pelos esporos nos juvenis recém-nascidos. Nesse dia, as unidades experimentais do tratamento P+ receberam uma alíquota de uma suspensão de esporos (2000 esporos/mL) obtida a partir das culturas infetadas (por homogeneização de hospedeiros infetados), ao passo que o tratamento P- recebeu um placebo (homogeneizado de hospedeiros saudáveis). Ao longo da experiência, as unidades experimentais foram sendo inspecionadas para confirmar a presença de esporos na cavidade corporal do hospedeiro (infeção) ou a presença de juvenis (evento reprodutivo). No final do ensaio, foi calculada a mortalidade (proporção de hospedeiros mortos) e o desempenho reprodutivo



**FIGURA 3** Desenho experimental dos ensaios laboratoriais com o modelo hospedeiro (crustáceo *Daphnia magna*) × parasita (levedura *Metschnikowia bicuspidata*), utilizados para estudar o impacto de fungicidas selecionados na interação entre estes dois organismos da teia alimentar de sistemas lacustres.

(n.º cumulativo de descendentes por progenitora) do hospedeiro, bem como a prevalência da infecção (proporção de hospedeiros infetados) e a carga parasitária (esporos/hospedeiro). Para mais detalhes, consultar Cuco *et al.* (2017a, 2017b, 2020) e Machado (2019).

A título exemplificativo, foram selecionados para este artigo os resultados obtidos para as substâncias ativas cimoxanil, metalaxil e miclobutanil (concentrações testadas: 0, 25, 50, 100 e 200 µg/L), usadas em várias formulações comerciais de fungicidas. Estas experiências têm um carácter essencialmente exploratório, e destinam-se a perceber de que forma a poluição aquática por fungicidas altera (ou não) a relação entre hospedeiro (*D. magna*) e o fungo microparasita (*M. bicuspidata*).

## 2.4. ENSAIOS DE INIBIÇÃO (EFEITO ANTI-PARASITA)

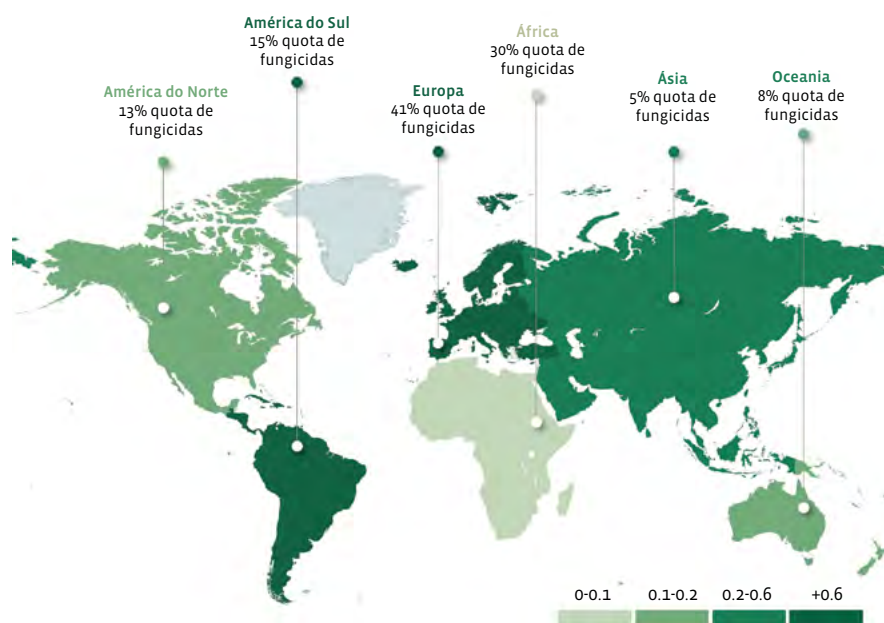
No caso das substâncias ativas para as quais foi observada um efeito antiparasita, procedeu-se a experiências adicionais com uma gama mais apertada de concentrações (e mais baixas) do que em 2.3, de modo a confirmar este efeito e a obter curvas de inibição do parasita (e da infecção) para estas substâncias. Resumidamente, grupos de 10 juvenis (com menos de 24 h) da espécie hospedeira (*D. magna*) foram expostos a concentrações de fungicidas selecionados (incluindo um controlo negativo, sem fungicida) na presença do parasita (*M. bicuspidata*), de acordo com o desenho experimental apresentado na Figura 3b. Excetuando o desenho experimental ligeiramente diferente, os restantes procedimentos e condições experimentais foram semelhantes ao descrito acima, incluindo o procedimento de infecção (desencadeado ao dia 4). Ao longo do ensaio, as unidades experimentais foram sendo inspecionadas para confirmar a presença de esporos na cavidade corporal dos hospedeiros (infecção) e, no final, foi calculada a mortalidade dos hospedeiros e a prevalência da infecção em cada unidade experimental. Para mais detalhes, consultar Cuco *et al.* (2017b) e Machado (2019).

A título exemplificativo, foram selecionados para este artigo os resultados obtidos para as substâncias ativas miclobutanil e tebuconazol, compostos da classe dos azóis usados em várias formulações comerciais de fungicidas.

# 3 RESULTADOS

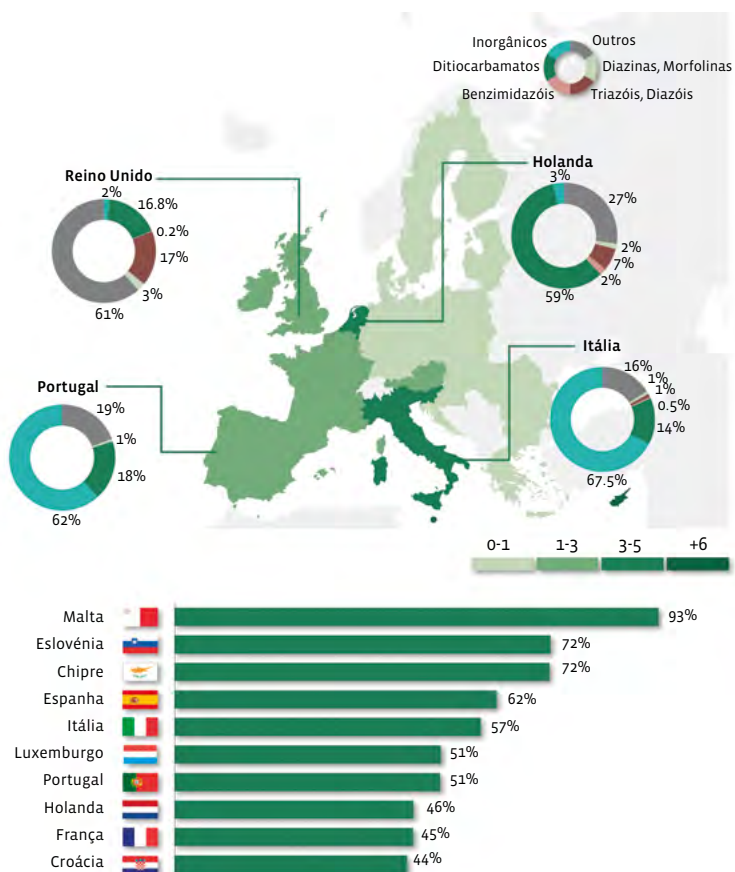
## 3.1. TENDÊNCIAS NO USO DE FUNGICIDAS

Globalmente, o uso de pesticidas na agricultura tem contribuído para o aumento do rendimento da produção agrícola, e isso tem-se refletido no aumento da sua procura. Em 2018, as vendas mundiais de pesticidas atingiram 4 122 334 toneladas, um número que representa o dobro das vendas em 1990. As vendas de fungicidas representaram apenas 13% das vendas à escala mundial (= 530 095 toneladas), só suplantadas pelos herbicidas (que em 2018 representaram 43% das vendas); todavia, estes números são extremamente heterogêneos entre regiões, quer do ponto de vista das vendas, quer do ponto de vista do uso. A Figura 4 representa o perfil de utilização dos fungicidas (em kg/ha) por continente em 2018, demonstrando que a sua utilização é mais intensa na Europa e na América do Sul. Um outro dado que sobressai desta análise é o facto dos fungicidas representarem 41% das vendas de pesticidas no continente europeu, colocando esta região do globo em destaque pela sua marcada dependência dos fungicidas na produção alimentar.



**FIGURA 4** Perfil de utilização de fungicidas por continente. O tom de verde traduz uma menor (mais claro) ou maior (mais escuro) aplicação de fungicidas por área de cultivo (kg/ha), ao passo que a informação textual diz respeito à fração (quota) que os fungicidas representam no total de pesticidas vendidos em cada continente.

Dentro do espaço europeu (UE-28), a utilização de fungicidas é também regionalmente heterogénea (Figura 5): (i) a região mais ocidental da Europa foi mais dependente dos fungicidas do que os países de leste; (ii) os países mediterrânicos, como Itália, Malta ou Chipre, foram os que utilizaram mais fungicidas por unidade de área, a par dos Países Baixos (Holanda). Quando se analisa os países mais dependentes de fungicidas (top-10 em termos de quota percentual), confirma-se que a maioria se situa a sul ou com algum nível de influência mediterrânica em termos de clima, excetuando o Luxemburgo e os Países Baixos. Um outro padrão que emerge dos dados é o perfil distinto de utilização/vendas em termos das classes químicas mais utilizadas, com os países mediterrânicos a utilizarem sobretudo compostos inorgânicos, como o enxofre e os produtos à base de cobre (veja-se o exemplo de Portugal e Itália na Figura 5), ao passo que os países mais a norte são mais dependentes de substâncias sintéticas como os ditiocarbamatos, os triazóis e diazóis, e outras classes de substâncias fungicidas (veja-se o exemplo do Reino Unido e Países Baixos na Figura 5).



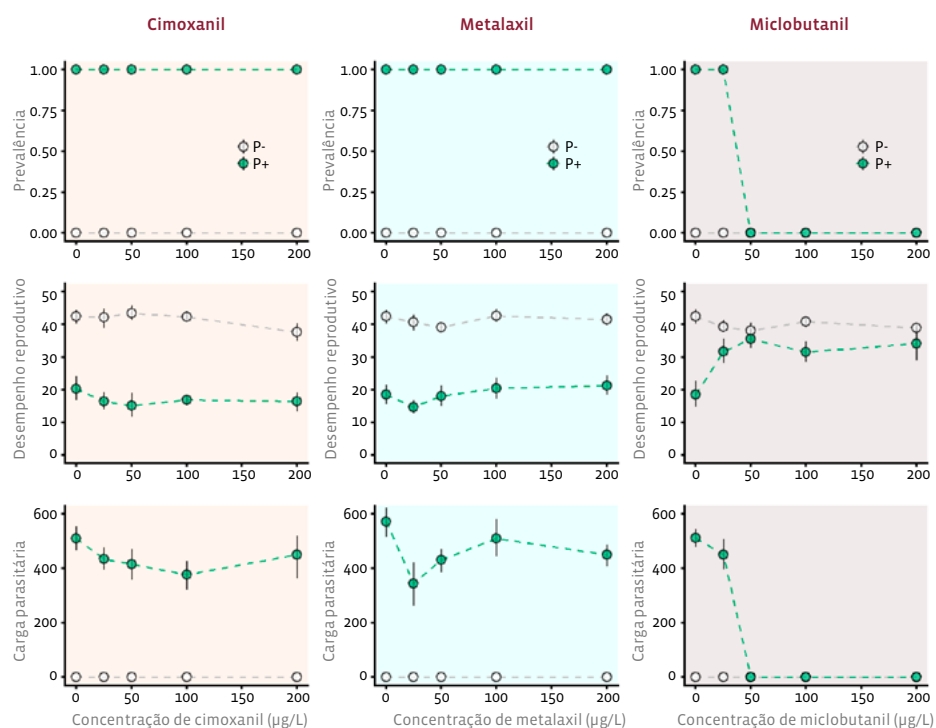
**FIGURA 5** Perfil de utilização de fungicidas na UE. No painel de cima, o tom de verde traduz uma menor (mais claro) ou maior (mais escuro) aplicação de fungicidas por área de cultivo (kg/ha); adicionalmente, é ilustrada a título exemplificativo a proporção de fungicidas por classe química em quatro países da UE. No painel de baixo, está representado o top10 de países em termos de quota de fungicidas (fração que os fungicidas representam no total de pesticidas vendidos).

Portugal atingiu, em 2018, vendas de 8.172 toneladas de pesticidas, das quais 4.183 toneladas foram de compostos com ação fungicida e bactericida. Estes números traduzem uma contração substancial nos anos recentes: em 2013, o total de vendas de pesticidas ultrapassava as 10.000 toneladas e os fungicidas e bactericidas representavam mais de 7.000 toneladas. Ao longo destes anos mais recentes (2013-2018), os compostos inorgânicos (enxofre e cobre) foram sempre a classe preponderante de fungicidas, representando uma quota (em termos de vendas de fungicidas) igual ou superior a 60%.

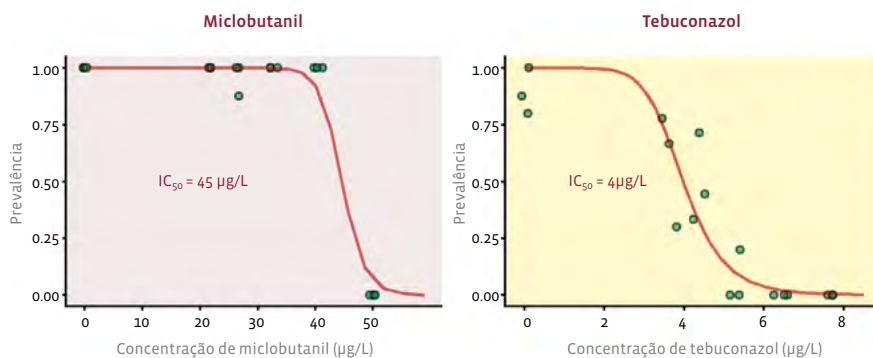
## 3.2. EFEITOS DE FUNGICIDAS SELECIONADOS NO MODELO HOSPEDEIRO-PARASITA

O perfil de resposta do modelo hospedeiro às três substâncias ativas fungicidas foi distinto (Figura 6). No caso do cimoxanil e do metalaxil ocorreram algumas flutuações nas variáveis quantificadas em resposta à concentração dos fungicidas, mas o resultado mais óbvio foi a clara dicotomia entre o tratamento com (P+) e sem parasita (P-). No primeiro caso, todos os hospedeiros (*D. magna*) ficaram infetados (prevalência = 1) e as suas cavidades corporais no final do ensaio encontravam-se preenchidas com aglomerações de esporos da levedura endoparasita (tipicamente > 400 000 esporos/hospedeiro; Figura 6). Com o decorrer da infeção, estes hospedeiros (P+) foram morrendo ao longo da experiência, o que se traduziu num menor desempenho reprodutivo comparativamente com o tratamento P- (Figura 6). O padrão aqui descrito para estas três variáveis (prevalência, desempenho reprodutivo e carga parasitária) foi consistente e independente da concentração de fungicida. Como tal, pode concluir-se que as substâncias cimoxanil e metalaxil não alteram a relação entre hospedeiro e parasita nem as consequências da doença.

Já no caso do miclobutanil, verificou-se uma clara alteração na resposta ao parasita e à infeção. Na ausência desta substância fungicida (0 µg/L), verificou-se um menor desempenho reprodutivo dos hospedeiros infetados (P+) a par de uma prevalência elevada do parasita; no entanto, a prevalência e a carga parasitária sofreram um decréscimo a partir de 50 µg/L de miclobutanil, e o desempenho reprodutivo dos hospedeiros atingiu níveis comparáveis aos do tratamento P- (Figura 6). A partir dessa concentração (inclusive) não se detetaram hospedeiros infetados no tratamento P+, o que revela um efeito antiparasita (e antifúngico) do miclobutanil que resultou na supressão da infeção nas concentrações mais altas desta substância ativa.



**FIGURA 6** Respostas do modelo hospedeiro-parasita quantificadas após os ensaios de interação para as substâncias ativas cimoxanil, metalaxil e miclobutanil na presença (P+, círculos a verde) ou ausência do parasita (P-, círculos a branco). A prevalência é uma medida de infetividade do parasita e representa a proporção de hospedeiros infetados; o desempenho reprodutivo é uma medida de aptidão do hospedeiro e corresponde ao n.º de descendentes por progenitora; a carga parasitária é uma medida de intensidade da infeção e é expressa em n.º de esporos ( $\times 1000$ ) por hospedeiro.



**FIGURA 7** Respostas do modelo hospedeiro-parasita quantificadas após os ensaios de inibição para as substâncias ativas miclobutanil e tebuconazol. Os pontos representam os valores obtidos para cada unidade experimental, e a linha representa o modelo não-linear ajustado aos dados que permitiu calcular a concentração de fungicida que reduz a prevalência (proporção de hospedeiros infetados) em 50% ( $IC_{50}$ ).



Este efeito negativo do miclobutanil no parasita (*M. bicuspidata*) foi confirmado em ensaios de inibição (Figura 7). Este efeito foi também observado para outra substância ativa da mesma classe química (azóis), o tebuconazol. O tebuconazol revelou ser mais tóxico do que o miclobutanil para a levedura endoparasita, produzindo 50% de efeito (IC<sub>50</sub>) a uma concentração de 4.0 µg/L (Figura 7). Estes compostos têm o potencial de alterar a dinâmica da doença (mediada por fungos parasitas) nos ecossistemas aquáticos.



Portugal atingiu, em 2018, vendas de 8172 toneladas de pesticidas, das quais 4183 toneladas foram de compostos com ação fungicida e bactericida.”



## 4 DISCUSSÃO

O uso de pesticidas está longe de ser sustentável. Esta é uma ideia repetida ao longo deste artigo e corroborada por outros (e.g., Kiss 2019), e que resulta das lacunas que ainda existem na implementação da Diretiva 2009/128/CE. É consensual que estas substâncias, aplicadas diretamente no ambiente, comprometem a biodiversidade, e os ecossistemas aquáticos são particularmente suscetíveis aos seus efeitos colaterais. Contudo, o atual momento é favorável a uma maior exigência na sustentabilidade da produção agrícola, especialmente na Europa. Já são vários os episódios que mostram uma opinião pública preocupada e consciente da problemática dos impactos dos pesticidas no ambiente e na saúde humana, bem como ações legislativas concretas (ver introdução) e uma estratégia política ambiciosa de valorização e proteção do capital natural (Pacto Ecológico Europeu). Este artigo pretende reforçar essa consciencialização e demonstrar – com recurso a estatísticas oficiais e evidências científicas de um projeto de investigação – que ainda estamos longe de um uso sustentável dos pesticidas.

Os dados de vendas e uso de pesticidas (fungicidas incluídos) revelam uma dinâmica heterogénea à escala global. Ao passo que as vendas têm aumentado à escala global, provavelmente devido ao crescimento nos países em desenvolvimento, a realidade europeia demonstra alguma estagnação ou

mesmo recuo nas vendas de pesticidas (como no caso português). Estas diferenças no consumo entre regiões do globo estão dependentes das diferenças económicas (Schreinemachers & Tipraqsa 2012) e da tendência populacional dos países (crescente nos países em desenvolvimento, e decrescente ou estável nos países desenvolvidos), mas também é fortemente ditada pelo uso do solo e variações climáticas (Sharma *et al.* 2019). No caso europeu, a tendência de estagnação pode ser resultado das políticas restritivas, mas também do investimento dos produtores em soluções mais eficientes (e.g., agricultura de precisão; Finger *et al.* 2019).

Apesar da estagnação das vendas de pesticidas na Europa, os dados apresentados deixam claro que os fungicidas ainda são fundamentais na produção agrícola no espaço europeu, e que a dependência destes na Europa é mais pronunciada do que noutras regiões do mundo (onde os inseticidas ou os herbicidas têm maior importância). Estes dados parecem ter correspondência nas misturas de químicos que têm como destino os sistemas aquáticos europeus: uma meta-análise conduzida por Stehle e Schulz (2015) registou concentrações de fungicidas em amostras de campo (mediana 0.96 µg/L) mais elevadas do que para herbicidas (mediana 0.063 µg/L) ou inseticidas (mediana 0.034 µg/L). Ainda assim, existem assimetrias evidentes entre países europeus, quer na importância relativa dos fungicidas quer no perfil de utilização das diversas classes químicas de substâncias ativas. São particularmente interessantes os países do sul da Europa (como Portugal), que apresentam uma quota reduzida de fungicidas orgânicos de síntese e uma forte dependência de formulações à base de cobre ou enxofre (teoricamente menos nocivos, muitos deles autorizados em agricultura biológica). Culturas como a vinha, economicamente importantes nos países mediterrânicos e fortemente dependentes da aplicação de fungicidas, contribuem significativamente para este padrão.

Foram identificadas lacunas de conhecimento importantes em termos dos impactos ecológicos dos fungicidas, nomeadamente pela falta de informação sobre os efeitos em organismos e interações tróficas até aqui negligenciados. Pela proximidade filogenética e fisiológica aos seus homólogos terrestres, os fungos e oomicetos aquáticos (que desempenham papéis vitais como decompositores, simbioses, ou agentes de doença) são potenciais alvos dos fungicidas que atingem os ecossistemas aquáticos, e o projeto FunG-Eye procura compreender que substâncias ativas podem ser particularmente perigosas para os processos e interações tróficas por eles mediados. Os resultados aqui apresentados demonstraram um claro efeito do miclobutanil e do tebuconazol sobre a levedura endoparasita *M. bicuspidata*, mas não das outras substâncias testadas (há outras já testadas, mas que não foram selecionadas para este artigo). Outros autores haviam já mostrado que substâncias fungicidas comuns podem reduzir a infetividade e a carga parasitária de fungos causadores de doenças, nomeadamente num grupo de

fungos parasitas (*Chytridiomycota*) que infeta anfíbios (Hanlon *et al.* 2012) e cianobactérias (Ortiz-Cañavate *et al.* 2019). Do resultado conjunto destes esforços será possível perceber que substâncias apresentam maior perigosidade e com isso representam um risco para os processos e interações ecológicas nos sistemas naturais. Tal poderá ser levado em consideração aquando da definição das substâncias ativas autorizadas (a lista é revista todos os anos pelas autoridades nacionais competentes e pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos – EFSA).

Os resultados do projeto FunG-Eye até agora têm demonstrado que o tebuconazol é uma substância à qual se deve dar particular relevância. A adicionar às evidências de que é capaz de interferir com a reprodução, biomassa e estrutura das comunidades de fungos decompositores aquáticos (Artigas *et al.* 2012; Fernández *et al.* 2015; Pimentão *et al.* 2020; Zubrod *et al.* 2011), este inibidor da biossíntese do ergosterol (componente chave das membranas celulares dos fungos) causou a supressão completa da infeção em experiências laboratoriais com o modelo *Daphnia* × *Metschnikowia* a concentrações ambientalmente relevantes (< 6 µg/L) – ver resultados aqui apresentados e em Cuco *et al.* (2018, 2017a, 2017b, 2020). Embora possa parecer positiva a erradicação de doenças (na “perspetiva” do hospedeiro), não é de todo desejável que as atividades humanas interfiram nas dinâmicas dos sistemas naturais. Os parasitas e agentes causadores de doenças desempenham um papel vital no controlo das populações de hospedeiros (impedindo que estes atinjam números muito elevados) e atuam como força seletiva através da permanente corrida às “armas” entre hospedeiro e parasita (coevolução). Os impactos antrópicos a este nível podem ter consequências ecológicas imprevisíveis no longo prazo, e justifica-se mantermo-nos atentos a substâncias capazes de perturbar as dinâmicas dos ecossistemas naturais. No caso particular do tebuconazol, o problema é agravado pelo facto deste fungicida poder coexistir no ambiente com substâncias que têm o mesmo modo de ação (inibição da síntese do ergosterol), incluindo o miclobutanil (agroquímico) e vários fármacos antifúngicos (Pimentão *et al.* 2020).

Num contexto mais amplo, tem havido discussões sobre o facto de a poluição aquática poder facilitar a propagação de doenças (como algumas evidências parecem sugerir; Johnson *et al.* 2007) e de que forma isso poderá afetar os humanos num contexto de alterações globais; as evidências aqui apresentadas para os fungicidas sugerem que a poluição pode também ter o efeito de impedir a disseminação de doenças, e não é ainda possível perceber quais as implicações mais amplas deste fenómeno. Apesar destas questões deixarem os cientistas numa encruzilhada, parece ser consensual que o nível de interferência das atividades humanas nos ecossistemas (num sentido ou noutro) é preocupante, e deve ser revertido para cumprir os objetivos ambiciosos da UE (no âmbito das ações do Pacto Ecológico Europeu).

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais (através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia) e pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (programas COMPETE2020 e PT2020) através do projeto de investigação FunG-Eye (POCI-01-0145-FEDER-029505) e dos programas estratégicos UID/BIA/04050/2019 e UDB/04050/20202. ARP é atualmente financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através de uma bolsa de doutoramento (SFRH/BD/06500/2020).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abelho M *et al.* (2015). Effects of the fungicide pyrimethanil on biofilm and organic matter processing in outdoor lentic mesocosms. *Ecotoxicology*, 25, 121-131.
- Antunes SC & Castro BB (2017). Pulgas-de-Água (*Daphnia* spp.). *Revista de Ciência Elementar*, 5, 8-11.
- Arias-Estévez *et al.* (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1, 247-260.
- Artigas J *et al.* (2012). Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams. *Aquatic Toxicology*, 122-123, 197-205.
- Balbus JM *et al.* (2013). Implications of global climate change for the assessment and management of human health risks of chemicals in the natural environment. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 32, 62-78.
- Bass C & Field LM (2018). Neonicotinoids. *Current Biology*, 28, 772-773.
- Bereswill R *et al.* (2012). Entry and toxicity of organic pesticides and copper in vineyard streams: Erosion rills jeopardise the efficiency of riparian buffer strips. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 146, 81-92.
- Bommarco R *et al.* (2013). Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 230-238.
- Cerejeira MJ *et al.* (2003). Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*, 37, 1055-1063.
- Cressey D (2017). The bitter battle over the world's most popular insecticides. *Nature*, 551, 156-158.
- Cuco AP *et al.* (2018). Temperature modulates the interaction between fungicide pollution and disease: evidence from a *Daphnia*-microparasitic yeast model. *Parasitology*, 145, 939-947.
- Cuco AP *et al.* (2017a). Interplay between fungicides and parasites: tebuconazole, but not copper, suppresses infection in a *Daphnia*-*Metschnikowia* experimental model. *PLoS ONE*, 12, e0172589.
- Cuco AP *et al.* (2017b). Concentration and timing of application reveal strong fungistatic effect of tebuconazole in a *Daphnia*-microparasitic yeast model. *Aquatic Toxicology*, 193, 144-151.
- Cuco, AP *et al.* (2020). Can parasites adapt to pollutants? A multigenerational experiment with a *Daphnia* × *Metschnikowia* model system exposed to the fungicide tebuconazole. *Aquatic Toxicology*, 226, 105584.
- DGAV (2018). Plano de Ação Nacional para o uso sustentável dos produtos fitofarmacêuticos - estabelecimento e implementação - 1ª revisão. Lisboa.
- Dighton J (2016). *Fungi in Ecosystem Processes*, Second Edition. Boca Raton, CRC Press.
- Dimitrov MR *et al.* (2014). Assessing effects of the fungicide tebuconazole to heterotrophic microbes in aquatic microcosms. *Science of the Total Environment*, 490, 1002-1011.
- Duarte S *et al.* (2006). Aquatic hyphomycete diversity and identity affect leaf litter decomposition in microcosms. *Oecologia*, 147, 658-666.
- Ebert D (2005). *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. National Center for Biotechnology Information.

- EFSA, Medina-Pastor P & Triacchini G (2020). The 2018 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, 18, 6057.
- EUROSTAT (2019). Agri-environmental indicator - consumption of pesticides Disponível em: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agri-environmental\\_indicator\\_-\\_consumption\\_of\\_pesticides](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agri-environmental_indicator_-_consumption_of_pesticides).
- Fernández D *et al.* (2015). Effects of fungicides on decomposer communities and litter decomposition in vineyard streams. *Science of the Total Environment*, 533, 40-48.
- Finger R *et al.* (2019). Precision farming at the nexus of agricultural production and the environment. *Annual Review of Resource Economics*, 11, 313-335.
- Fraga H *et al.* (2017). Viticulture in Portugal: A review of recent trends and climate change projections. *Oeno One*, 51, 61-69.
- Fu B *et al.* (2013). Linking ecosystem processes and ecosystem services. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 5, 4-10.
- Graça MAS (2001). The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams - a review. *International Review of Hydrobiology*, 86, 383-393.
- Grossart HP *et al.* (2019). Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 339-354.
- Hanlon SM *et al.* (2012). Unlikely remedy: Fungicide clears infection from pathogenic fungus in larval southern leopard frogs (*Lithobates sphenoccephalus*). *PLoS ONE*, 7, e43573.
- Hesse O *et al.* (2012). Fighting parasites and predators: how to deal with multiple threats? *BMC ecology*, 12, 12.
- Ittner LD *et al.* (2018). Aquatic fungi: a disregarded trophic level in ecological risk assessment of organic fungicides. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 105.
- Johnson PTJ *et al.* (2007). Aquatic eutrophication promotes pathogenic infection in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 15781-15786.
- Kahle M *et al.* (2008). Azole fungicides: Occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environmental Science and Technology*, 42, 7193-7200.
- Kiss J. (2019). Pesticides in agriculture: are we sustainable yet? *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 7, 205-207.
- Kudsk P & Mathiassen SK (2020). Pesticide regulation in the European Union and the glyphosate controversy. *Weed Science*, 68, 214-222.
- Liu Y *et al.* (2014). A 1961–2010 record of fertilizer use, pesticide application and cereal yields: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 83-93.
- Lohr JN *et al.* (2010). Prior residency does not always pay off-co-infections in *Daphnia*. *Parasitology*, 137, 1493-1500.
- Loureiro C *et al.* (2011). Performance of standard media in toxicological assessments with *Daphnia magna*: chelators and ionic composition versus metal toxicity. *Ecotoxicology*, 20, 139-148.
- Machado C (2019). Cenários interativos entre a contaminação por fungicidas e parasitismo. Universidade do Minho. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1822/65240>
- Machado CM & Castro B (2019). Relações hospedeiro-parasita. *Revista de Ciência Elementar*, 7, 1-5.
- Malaj E *et al.* (2014). Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 9549-9554.
- Ortiz-Cañavate BK *et al.* (2019). Fungicides at environmentally relevant concentrations can promote the proliferation of toxic bloom-forming cyanobacteria by inhibiting natural fungal parasite epidemics. *Chemosphere*, 229, 18-21.
- Pascoal C *et al.* (2005). Role of fungi, bacteria, and invertebrates in leaf litter breakdown in a polluted river. *Journal of the North American Benthological Society*, 24, 784-797.
- Pimentão AR *et al.* (2020). Fungistatic effect of agrochemical and pharmaceutical fungicides on non-target aquatic decomposers does not translate into decreased fungi- or invertebrate-mediated decomposition. *Science of the Total Environment*, 712, 135676.

- Saebefeld M *et al.* (2017). Humic dissolved organic carbon drives oxidative stress and severe fitness impairments in *Daphnia*. *Aquatic Toxicology*, 182, 31-38.
- Schäfer RB *et al.* (2019). Future pesticide risk assessment: narrowing the gap between intention and reality. *Environmental Sciences Europe*, 31, 1-5.
- Schreinemachers P & Tipraqsa P (2012). Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy*, 37, 616-626.
- Schwarzenbach RP *et al.* (2009). The Challenge of Micropollutants. *Science and Technology*, 313, 1072-1077.
- Schwarzenbach RP *et al.* (2010). Global Water Pollution and Human Health. *Annual Review of Environment and Resources*, 35, 109-136.
- Sharma A *et al.* (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences* 1:11, 1, 1-16.
- Souza RM *et al.* (2020). Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. *Process Safety and Environmental Protection*, 135, 22-37.
- Stehle S & Schulz R (2015). Pesticide authorization in the EU—environment unprotected? *Environmental Science and Pollution Research*, 22:24, 22, 19632-19647.
- Topping CJ *et al.* (2020). Overhaul environmental risk assessment for pesticides. *Science*, 367, 360-363.
- Wilson ER *et al.* (2014). Assessing the potential effects of fungicides on nontarget gut fungi (*Trichomyces*) and their associated larval black fly hosts. *Journal of the American Water Resources Association*, 50, 420-433.
- Wolinska J & King KC (2009). Environment can alter selection in host-parasite interactions. *Trends in Parasitology*, 25, 236-244.
- Wolinska J & Spaak P (2009). The cost of being common: evidence from natural *Daphnia* populations. *Evolution: international journal of organic evolution*, 63, 1893-1901.
- Zubrod JP *et al.* (2015). Does the current fungicide risk assessment provide sufficient protection for key drivers in aquatic ecosystem functioning? *Environmental Science and Technology*, 49, 1173-1181.
- Zubrod JP *et al.* (2019). Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environmental Science and Technology*, 53, 3347-3365.
- Zubrod JP *et al.* (2011). Ecotoxicological impact of the fungicide tebuconazole on an aquatic decomposer-detritivore system. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 30, 2718-2724.

### Contribuição dos autores

BBC e AP conceberam a ideia original e BBC escreveu o artigo. ARP, CM e AP geraram, recolheram e analisaram os dados apresentados, sob supervisão de BBC. Todos os autores contribuíram de alguma forma para as imagens e ilustrações apresentadas.

### Informação dos autores

BBC é professor e investigador na Universidade do Minho, onde se dedica à investigação na interface entre a Ecologia, a Ecofisiologia e a Ecotoxicologia aquáticas. Interessa-se sobretudo em compreender como as atividades humanas podem produzir mudanças ecológicas subtis nas teias alimentares aquáticas, em particular nas interações tróficas entre os organismos. É o investigador responsável do projeto FunG-Eye. APC é investigadora contratada no âmbito do projeto FunG-Eye, e esteve na génese da ideia do projeto com BBC. Entretanto, o projeto acolheu vários estudantes de pós-graduação que abraçaram este tema, incluindo CM e ARP, que desenvolveram atividades de investigação no âmbito do FunG-Eye e que mantiveram uma ligação de continuidade ao projeto mesmo após conclusão das suas etapas de pós-graduação.

### Conflito de interesses

Os autores declaram não ter quaisquer conflitos de interesse. As opiniões aqui expressas traduzem a visão dos autores, suportada na discussão e análise de dados concretos. As entidades empregadoras ou financiadoras não desempenharam nenhum papel na conceção ou nas conclusões do trabalho.

