

ECOTOXICIDADE DE HERBICIDAS PARA A MACRÓFITA AQUÁTICA (*Azolla caroliniana*)¹

*Ecotoxicity of Herbicides for the Aquatic Macrophyte (*Azolla caroliniana*)*

SILVA, A.F.², CRUZ, C.³, NETO, A.N.⁴ e PITELLI, R.A.⁵

RESUMO - Os objetivos deste estudo foram avaliar *Azolla caroliniana* como planta-teste em estudos ecotoxicológicos e estimar a CL50;7d dos herbicidas 2,4-D, glyphosate, clomazone e oxyfluorfen. As plantas foram aclimatadas em sala de bioensaio. Para isso, foram selecionadas cinco plantas em 50 mL de meio de cultivo Hoagland. Após esse período, foram adicionados 50 mL de Hoagland mais o herbicida, completando o volume para 100 mL. A concentração letal de 50% (CL50;7d) para *A. caroliniana* exposta ao herbicida 2,4-D foi de 708,35 mg L⁻¹; ao glyphosate (formulação Scout®), de 23,66 mg L⁻¹; ao glyphosate (formulação Trop®), de 38,91 mg L⁻¹; ao clomazone, de 129,63 mg L⁻¹; e ao oxyfluorfen, de 80,50 mg L⁻¹. Os herbicidas glyphosate (Scout® e Trop®) e oxyfluorfen foram classificados como moderadamente tóxicos a *A. caroliniana*, e o clomazone e o 2,4-D, como praticamente não tóxicos. Conclui-se que *A. caroliniana* pode ser utilizada como planta bioindicadora de herbicidas à base de glyphosate e oxyfluorfen.

Palavras-chave: bioindicador, toxicidade aguda, produtos fitossanitários, macrófita.

ABSTRACT - The objectives of this study were to evaluate *Azolla caroliniana* as test plant in ecotoxicological studies and to estimate the LC50; 7d of the herbicides 2,4 D, glyphosate, and clomazone oxyfluorfen. The plants were acclimatized in the bioassay room. Five plants in 50 mL Hoagland culture medium were selected. After that, 50 mL of Hoagland and the herbicide were added, completing the volume to 100 mL. The 50% lethal concentration (LC50; 7d) for *A. caroliniana* exposed to the herbicide 2,4-D, was 708.35 mg L⁻¹; to glyphosate (formulation Scout®), 23.66 mg L⁻¹; to glyphosate (formulation Trop®), 38.91 mg L⁻¹; to clomazone, 129.63 mg L⁻¹; and to oxyfluorfen, 80.50 mg L⁻¹. The herbicides glyphosate (Scout® and Trop®) and oxyfluorfen were classified as moderately toxic to *A. caroliniana*, while clomazone and 2,4-D were classified as practically non-toxic. It was concluded that *A. caroliniana* plants can be used as bio-indicators for glyphosate and oxyfluorfen-based herbicides.

Keywords: bioindicator, acute toxicity, pesticides, macrophytes.

INTRODUÇÃO

A agricultura está diretamente relacionada com a utilização de agrotóxicos, especialmente para controle das plantas daninhas que competem com os cultivares de interesse comercial. A utilização de herbicidas pode

causar impactos ao ambiente terrestre ou aquático. Uma das principais vias de transporte para o ambiente aquático é o carregamento superficial e lixiviação de áreas agrícolas, que pode ser influenciado pela tecnologia de aplicação e toxicidade da formulação (Primel et al., 2005).

¹ Recebido para publicação em 16.1.2012 e aprovado em 23.7.2012.

² Biólogo, Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp, Campus de Jaboticabal, <adilsonf.s@hotmail.com> ³ Dr. em Aquicultura, Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp, Campus de Jaboticabal, <claudineicruz@pq.cnpq.br>; ⁴ Biólogo, Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp, Campus de Jaboticabal, <naderneto@yahoo.com.br>; ⁵ Professor Voluntário, Dep. de Fitossanidade, FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, <rapitelli@ecosafe.agr.br>.



O Brasil tornou-se o maior consumidor mundial de agrotóxicos (Sindag, 2009), com destaque para os herbicidas. Entre os ingredientes ativos disponíveis no mercado, têm-se o glyphosate, utilizado por ter efetivo controle de muitas espécies daninhas (Bridges, 2003); o 2,4-D (sal dimetilamina do ácido diclorofenoxiacético), pertencente ao grupo dos mimetizadores de auxina, muito usado na dessecação de áreas agrícolas (Benli et al., 2007); o oxyflourfen, pertencente ao grupo dos inibidores da síntese de Prototox, muito utilizado para controle de plantas daninhas em pré-emergência (Tanaka et al., 2002); e o clomazone, pertencente à classe dos inibidores da síntese de carotenoides, que resulta na perda de praticamente todos os pigmentos da planta (albinismo) (Ferhatoglu et al., 2005).

Um dos principais problemas para avaliação dos possíveis efeitos dos herbicidas no ambiente é o desenvolvimento de organismos sentinelas ou bioindicadores. A caracterização de um bioindicador requer uma série de informações sobre sensibilidade, ciclo reprodutivo, facilidade de operação e custo de otimização (Mann & Bidwell, 1999).

Devido à acentuada sensibilidade, as macrófitas aquáticas são utilizadas nos estudos ecotoxicológicos com herbicidas (Mann & Bidwell, 1999). De acordo com Lumpkin & Pluckneet (1980), *Azolla* sp. é uma planta aquática flutuante que pode ser utilizada como bioindicador devido a: facilidade de manejo, ciclo de vida curto, pequeno porte e por ser cosmopolita, porém há poucas informações referentes ao uso dessa planta como espécie bioindicadora. *A. pinnata* foi utilizada na remoção de zinco e chumbo em águas poluídas (Vasudevan & Jha, 1990); *A. filiculoides*, na biorremediação da sulphadimethoxine (Forni et al., 2002); *A. pinnata*, na redução da atividade da nitrogenase, meia-vida do nitrato e efeito do cloreto de sódio em seu crescimento (Rai & Rai, 2003); *A. caroliniana*, na remoção do mercúrio e cromo em efluentes (Bennicelli et al., 2004), bem como na remoção do herbicida atrazina em ambientes aquáticos (Guimarães, 2006), porém não foi observada na literatura utilização desta planta em estudos de ecotoxicidade de herbicidas.

A planta padronizada para ensaios ecotoxicológicos é a *Lemna minor* (OECD, 2002),

utilizada para os herbicidas methyl bensulfuron, mefenacet, simetryn, thiobencarb e quinoclamine (Aida et al., 2006), 2,4-D (Belgers et al., 2007), diquat e fomesafen (Gorzerino et al., 2009), atrazina, isoproturon e alachlor (Coutris et al., 2011) e glyphosate (Roundup Ultra 360) (Kielak et al., 2011).

Assim, devido a poucas opções de macrófitas aquáticas disponíveis como modelo de plantas-teste em ensaios ecotoxicológicos e em monitoramento de herbicidas em ambiente aquático, o objetivo deste estudo foi avaliar *A. caroliniana* como planta-teste em ensaios agudos com herbicidas. Para isso, foi realizado ensaio de toxicidade aguda (CL50;7d) e a avaliação da porcentagem de mortalidade dessa macrófita exposta aos herbicidas 2,4-D, glyphosate (Scout®, Trop®), clomazone e oxyfluorfen.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo da planta-teste

As macrófitas foram cultivadas em caixa plástica com volume de 2,5 litros, contendo água e substrato composto por solo, areia e matéria orgânica (2:1:1; vv⁻¹), em casa de vegetação com as seguintes variáveis de qualidade de água: pH de 8,16; temperatura, 22,2 °C; condutividade elétrica, 200,0 µScm⁻¹; e oxigênio dissolvido em 8,39 mg L⁻¹.

Aclimação e procedimento experimental

A aclimação de *A. caroliniana* foi realizada em sala de bioensaio, com temperatura de 23 a 27 °C e iluminação constante de 1.000 lux por três dias. Após aclimação, as plantas foram desinfetadas com solução aquosa de hipoclorito de sódio 3% e água destilada. Em seguida, foram selecionadas cinco plantas em recipiente de vidro com capacidade para 100 mL contendo 50 mL de meio de cultivo Hoagland, por mais 24 horas. Após esse período, foram adicionados 50 mL de Hoagland com o herbicida a ser testado.

A avaliação da porcentagem de mortalidade das plantas foi realizada em três, cinco e sete dias após exposição aos herbicidas, utilizando a escala de notas (E a A) de acordo com Velini et al. (1995). As notas foram

transformadas em porcentagens de mortalidade, e cada planta clorótica e/ou necrótica correspondeu a 20% de mortalidade, sendo A entre 91 e 100%; B, entre 81 e 90%; C, entre 71 e 80%; D, entre 41 e 70%; e E, entre 0 e 40% de mortalidade.

Nos ensaios de toxicidade aguda do herbicida 2,4-D foram utilizadas as concentrações de 400, 600, 800 e 900 mg L⁻¹; para o glyphosate (Scout®), 5, 10, 15, 30, 50 e 100 mg L⁻¹; para o glyphosate (Trop®), 10, 20, 30, 40, 50 e 100 mg L⁻¹; para o clomazone, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180 e 200 mg L⁻¹; e para o oxyfluorfen, 10, 40, 80, 120, 160, 180 e 210 mg L⁻¹, todos com um controle (testemunha) e três réplicas por concentração.

Os resultados de mortalidade de *A. caroliniana* foram submetidos à regressão linear, e a toxicidade aguda, expressa como CL50;7d (concentração letal 50% - 7 dias), dos herbicidas foi calculada pelo software Trimmed Spermam Karber (Hamilton et al., 1978).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios de toxicidade aguda (CL50;7d) o glyphosate (Scout®) foi o mais tóxico entre os herbicidas testados, enquanto o 2,4-D foi o herbicida menos tóxico e os demais tiveram toxicidade intermediária para *A. caroliniana*. A ordem de CL50;7d para *A. caroliniana* foi glyphosate (Scout®) > glyphosate (Trop®) > oxyfluorfen > clomazone > 2,4-D (Tabela 1).

No ensaio de toxicidade aguda com o herbicida glyphosate (Scout®), em 5,0 mg L⁻¹ não ocorreu mortalidade; em 10 mg L⁻¹ a mortalidade foi de 3,33%; em 15, de 10,00%; em 30, de 73,33%; em 50, de 96,67%; e em 100 mg L⁻¹, de 100,00% (Figura 1A). Para o glyphosate (Trop®) não ocorreu mortalidade em 10 mg L⁻¹; em 20 mg L⁻¹, foi de 10,00%; em 30, de 23,33%; em 40, de 43,33%; em 50, de 76,67%; e em 100 mg L⁻¹, de 100,00% (Figura 1B).

O glyphosate é um produto sistêmico que atua em baixa concentração na planta (Nilsson, 1985), sendo encontrados neste estudo valores de CL50;7d de 23,66 e 38, 91 mg L⁻¹ (Scout® e Trop®) com exposição à solução-teste de 168 horas. Assim, pode-se inferir que a absorção desse herbicida foi

pequena, devido à presença de EDTA na solução nutritiva do meio de cultivo Hoagland. Segundo Nilsson (1985), vários metais que ocorrem em águas naturais retardam o movimento e reduzem a fitotoxicidade do glyphosate, em razão de suas propriedades quelantes.

A concentração letal de 50% (CL50;7d) da *A. caroliniana* exposta ao glyphosate foi semelhante à da macrófita aquática *Spirodella punctata* > 30 mg L⁻¹ (Santos et al., 2001). Segundo Kielak et al. (2011), avaliando o glyphosate (Roundup Ultra 360 SL) para *L. minor*, ocorreu redução da clorofila a+b e biomassa com o aumento nas concentrações do herbicida (22 no controle para 9 mg g⁻¹ em 31,58 nM e 450 no controle para 50 mg de biomassa em 31,58 nM, respectivamente).

Para o oxyfluorfen em 10 mg L⁻¹ a mortalidade foi de 28,33%; em 40, de 20,00%; em 80, de 50,00%; em 120, de 61,67%; em 160, de 85,00%; em 180, de 93,33%; e em 210,0 mg L⁻¹, de 100,00% (Figura 1C).

O mecanismo de ação do oxyfluorfen pode ter interferido na biossíntese da clorofila e na oxidação da enzima protoporfirinogênio oxidase, causando mortalidade das macrófitas aquáticas *Egeria densa* (1.000 e 10.000 mg L⁻¹) e *Egeria najas* (100, 1.000 e 10.000 mg L⁻¹) (Tanaka et al., 2002); para *Lemna minor* exposta ao herbicida fomesafen, que pertence à mesma classe do oxyfluorfen, houve 4% de mortalidade nas concentrações de 0,044 e 0,22 mg L⁻¹ (Gorzerino et al., 2009).

Para o clomazone em 90 mg L⁻¹ houve 16,67% de mortalidade; em 105, 33,33%; em 120, 36,67%; em 135, 46,67%; em 150, 63,33%; em 165, 83,33%; em 180, 93,33%; e em 200 mg L⁻¹, 100,00% (Figura 1D).

A. caroliniana exposta ao herbicida clomazone nas maiores doses testadas (0,6 e 0,8 mg L⁻¹) apresentou fitotoxicidade (Ferrari et al., 2000), devido a ensaios de campo em condições controladas. As macrófitas aquáticas *E. densa* e *E. najas* expostas ao herbicida clomazone em 100, 1.000 e 10.000 mg L⁻¹ apresentaram mortalidade (Tanaka et al., 2002), em condições de campo, em caixa-d'água e represa de pequeno porte, onde as plantas permaneceram em condições não controladas.



Tabela 1 - Toxicidade aguda dos herbicidas para a macrófita aquática *A. caroliniana*

Herbicida testado	L. inferior (mg L ⁻¹)	CL50;7dias (mg L ⁻¹)	L. superior (mg L ⁻¹)
Glyphosate (Scout®)	22,09	23,66	25,34
Glyphosate (Trop®)	36,51	38,91	41,48
Oxyfluorfen	70,36	80,50	90,12
Clomazone	124,93	129,63	134,51
2,4-D	685,53	708,35	731,94

Para o 2,4-D em 400 mg L⁻¹ não houve mortalidade; em 600 mg L⁻¹, a mortalidade foi de 16,67%; em 800, de 60,00%; e em 900 mg L⁻¹, de 100,00% (Figura 1E). Foi observada mortalidade de *E. densa* e *E. najas*

expostas a 1.000 e 10.000 mg L⁻¹ do herbicida 2,4-D, e nas concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 10; e 100 mg L⁻¹ ocorreu estímulo ao crescimento das macrófitas (Tanaka et al., 2002). Para *Myriophyllum spicatum* ocorreu efeito inibitório de 50% em 0,04 mg L⁻¹ (Bird, 1993), porém, para *Lemna trisulca*, o 2,4-D não apresentou efeito fitotóxico em concentrações até 3,0 mg L⁻¹ (Belgers et al., 2007). As concentrações do herbicida 2,4-D que causaram fitotoxicidade neste estudo (Figura 1E) não foram semelhantes às encontradas pelos autores supracitados, talvez por *A. caroliniana* ser monocotiledônea e apresentar sensibilidade maior que a das macrófitas *E. densa* e *E. najas* e menor que a de *M. spicatum*.

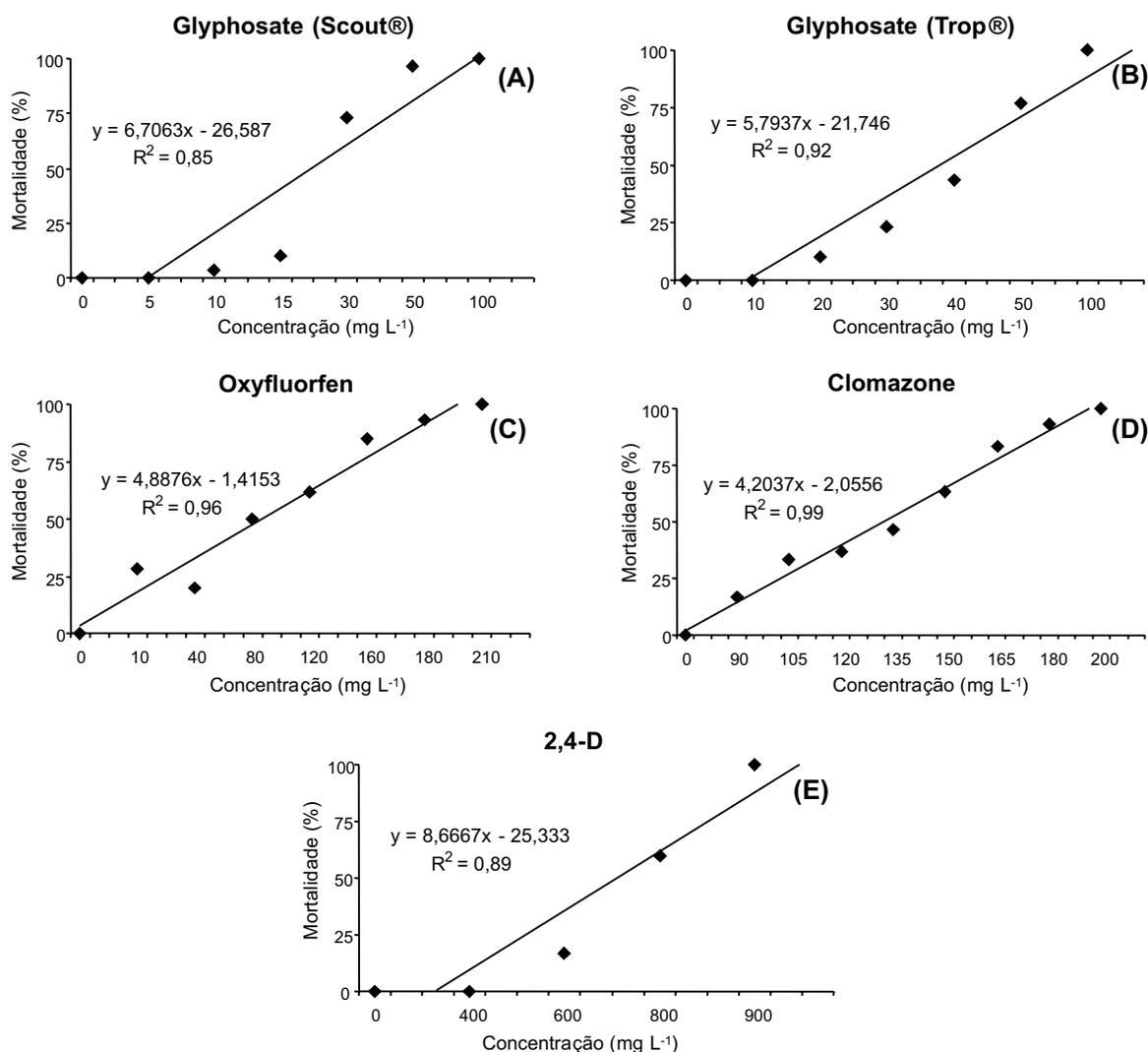


Figura 1 - Porcentagens de mortalidade da macrófita aquática *A. caroliniana* exposta aos herbicidas.

Devido a isso, pode-se inferir que *A. caroliniana* não possui grande sensibilidade ao 2,4-D, em comparação com a resposta de sensibilidade apresentada pelo *M. spicatum*.

A. caroliniana foi mais sensível a atrazina em relação aos herbicidas testados (glyphosate formulação Scout e Trop, oxyfluorfen, clomazone e 2,4-D), o que evidencia a necessidade de mais estudos de ecotoxicidade de herbicidas para essa planta aquática. Segundo Guimarães (2006), a *A. caroliniana* utilizada na remoção de atrazina em ambiente aquático apresentou mortalidade em 10,0 mg L⁻¹.

As macrófitas aquáticas *Azolla filiculoides* e *Lemna minor* foram mais sensíveis à mistura de herbicidas (50% atrazina, 35% isoproturon, 15% alachlor); *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis* e *Myriophyllum spicatum* exibiram sensibilidade intermediária; e *Vallisneria spiralis* foi mais resistente à exposição em 0,6 mg L⁻¹ (Coutries et al., 2011). A concentração letal de 50% (CL50) dos herbicidas metsulfuron- methyl e terbutylazine para *Lemna minor* foi de 0,040 e 0,111 mg L⁻¹, respectivamente (Cedergreen et al., 2004), indicando resposta heterogênea das diferentes espécies aos grupos de herbicidas avaliados.

De acordo com Zucker (1985), os herbicidas glyphosate (Scout® e Trop®) e oxyfluorfen foram classificados como moderadamente tóxicos por apresentarem valores de CL50 entre 10 e 100 mg L⁻¹; o clomazone e o 2,4-D foram classificados como praticamente não tóxicos para *A. caroliniana* por apresentarem CL50 acima de 100 mg L⁻¹.

De acordo com os resultados, *A. caroliniana* pode ser empregada no monitoramento de herbicidas à base de glyphosate e de oxyfluorfen, pela grande sensibilidade desse bioindicador na detecção desses herbicidas amplamente utilizados, podendo ser usada em estudos complementares de ecotoxicologia e monitoramento ambiental de herbicidas.

LITERATURA CITADA

- AIDA, M. et al. Effects of five rice herbicides on the growth of two threatened aquatic ferns. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 63, n. 3, p.463-468, 2006.
- BELGERS, J. D. M. et al. Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of the nine aquatic macrophytes, **Aquatic Bot.**, v. 86, n. 3, p. 260-268, 2007.
- BENNICELLI, R. et al. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metal (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal waste water. Short communication. **Chemosphere**, v. 55, n. 1, p. 141-146, 2004.
- BENLI, A. Ç. K. et al. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 88, n. 3, p. 296-299, 2007.
- BIRD, K. T. Comparisons of herbicide toxicity using in vitro cultures of *Myriophyllum spicatum*. **J. Aquatic Plant Manag.**, v. 31, n. 1, p. 44 1993.
- BRIDGES, D. C. Glyphosate-type herbicides. In: BRIDGES, D. C. **Herbicide action course**. West Lafayette: Purdue University, 2003. p. 501-513.
- CEDERGREEN, N. et al. Species-specific sensitivity of aquatic macrophytes towards two herbicides. Rapid Communication. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 58, n. 3, p. 314-323, 2004.
- COUTRIES, C. et al. Can we predict community-wide effect of herbicides from toxicity tests on macrophytes species. **Aquatic Toxicol.**, v. 101, n. 1, p. 40-56, 2011.
- FERHATOGLU, Y. et al. The basic for safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 81, n. 1, p. 59-70, 2005
- FERRARI, C. K. et al. Crescimento e conversão da energia solar da *Azolla caroliniana* em função de doses de herbicidas. **Agropec. Clima Temperado**, v. 3, n. 1, p. 53, 2000.
- FORNI, C. et al. Sulphadimethoxine and *Azolla filiculoides* Lam.: a model for drug remediation. **Water Res.**, v. 36, n. 13, p. 398-3403, 2002.
- GORZERINO, C. et al. Effects of diquat and fomesafen applied alone and in combination with a nonylphenol polyethoxylate adjuvant on *Lemna minor* in aquatic indoor microcosms. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 72, n. 3, p. 802-810, 2009.
- GUIMARÃES, F.P. **Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa**. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- HALMITON, M. A. et al. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, v. 12, n. 4, p. 714-719, 1978.
- KIELAK, E. et al. Phytotoxicity of Roundup Ultra 360 SL in aquatic ecosystems: Biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 99, n. 3, p. 237-243, 2011.



- LUMPKIN, T. A.; PLUCKNEET, D. L. *Azolla*: botany, physiology and use as green manure. **Soc. Econ. Bot.**, v. 34, p. 111-113, 1980.
- MANN, R. M.; BIDWELL, R. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 36, n. 2, p. 193-199, 1999.
- NILSSON, G. Interactions between glyphosate and metals essential for plant growth. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 35-48.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. **Guidelines for the testing of chemicals**, *Lemna* sp. Growth inhibition test. Paris-França: 2002. 22 p.
- PRIMEL, E. G. et al. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo de arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do sul, Brasil: Predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 605-609, 2005.
- RAI, A. K.; RAI, V. Effect of NaCl on growth, nitrate uptake and reduction and nitrogease activity of *Azolla pinnata*-*Anabaena azollae*. **Plant Sci.**, v. 164, n. 1, p. 61-69, 2003.
- SANTOS, D. M. M. et al. Efeito de herbicidas em *Spirodela punctata* (G.F.W.Meyer) Thompson (Lemnaceae) cultivada em diferentes soluções nutritivas. **R. Ecosist.**, v. 26, n. 1, p. 63, 2001.
- SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTO PARA A DEFESA AGRÍCOLA – SINDAG. **Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos**. Sindag News, 07/08/2009.
- TANAKA, R. H. et al. Avaliação de herbicidas para o controle de egérias em laboratório, caixa d'água e represa sem fluxo de água. **Planta Daninha**, v. 20, p. 73-83, 2002. (Edição Especial)
- VASUDEVAN, S. K. J.; JHA, N. K. *Azolla pinnata* R.Br. and *Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water. **Water Res.**, v. 24, n. 2, p. 177-183, 1990.
- VELINI, E. D. et al. Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos, com herbicidas. Londrina: SBCPD, 1995. 42 p.
- ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure Acute toxicity test for freshwater fish. **USEPA Publication** 540/9-85-006, 1985.

