

Alterações fisiológicas na cultura do tomateiro devido à deriva simulada de herbicidas¹

Physiological changes in tomato crop due to simulated drift of herbicides

Ana Claudia Langaro²; Marcos André Nohatto³; Lais Tessari Perboni⁴; Camila Peligrinotti Tarouco⁵; Dirceu Agostinetto⁶

Resumo - A deriva acidental pode ocorrer como consequência da aplicação de herbicidas. No entanto, pouco se sabe em relação às alterações fisiológicas nas culturas em função da deriva de herbicidas. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da deriva simulada dos herbicidas glifosato e clomazona na cultura do tomateiro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os tratamentos arranjados em esquema fatorial, onde o fator A comparou os herbicidas (glifosato e clomazona) e o fator B as doses (0; 12,5; 25; 37,5 e 50% da dose comercial). Foram avaliados: conteúdo de fenóis totais, teores de clorofilas (a, b e total) e carotenoides, peroxidação lipídica e extravasamento de eletrólitos. O aumento da dose dos herbicidas resultou em aumento do conteúdo de fenóis totais e maior extravasamento de eletrólitos nas plantas. A deriva do herbicida glifosato resulta em redução dos pigmentos fotossintéticos e ocasiona maior peroxidação lipídica das membranas na cultura do tomate, comparado ao clomazona. Pode-se concluir que a deriva acidental altera o metabolismo das plantas de tomate, acarretando estresse oxidativo.

Palavras-chaves: *Lycopersicum esculentum*, clomazona, glifosato, estresse oxidativo, metabolismo secundário

Abstract - The accidental drift can occur as a result of the herbicide application. However, little is known regarding the physiological changes in crops resulting from herbicide drift. The aim of the study was to evaluate the effects of simulated drift of glyphosate and clomazone in tomato. The experimental scheme was randomized and the treatments arranged in a factorial design, where factor A compared herbicides (glyphosate or clomazone) and factor B rates (0, 12.5, 25, 37.5 and 50% of the recommended rate). Content of total phenols, chlorophyll contents (a, b and total) and carotenoids, lipid peroxidation and electrolyte leakage were evaluated. Increasing rates of herbicides resulted in increased content of total phenols and electrolyte leakage in plants. Drift of herbicide glyphosate results in the reduction of photosynthetic pigments and causes higher lipid peroxidation of membranes in tomato, compared to clomazone. The accidental drift results in alteration in the metabolism of tomato plants, resulting in oxidative stress.

Keywords: *Lycopersicum esculentum*, clomazone, glyphosate, oxidative stress, secondary metabolism

¹ Recebido para publicação em 15/09/2014 e aceito em 25/05/2015.

² Mestre em Fitossanidade – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. namelia.langaro@gmail.com (*autor para correspondência)

³ Doutor em Fitossanidade – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴ Mestre em Fitossanidade – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁵ Doutora em Fitossanidade – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁶ Professor Adjunto – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Introdução

Os herbicidas glifosato e clomazona destacam-se dentre os utilizados nas lavouras de soja e arroz, respectivamente. Dentre os princípios ativos utilizados para a dessecação, o glifosato é o mais empregado por se tratar de herbicida não seletivo, com ação sistêmica, apresentando controle sobre plantas daninhas anuais e perenes (Timossi et al., 2006). O uso predominante do glifosato em culturas resistentes tem aumentado as oportunidades de ocorrência de deriva (Johnson et al., 2006). O clomazona é herbicida seletivo, utilizado em pré ou pós-emergência inicial no controle de plantas daninhas na cultura do arroz irrigado no Sul do Brasil (Andres & Machado, 2004). Devido as suas características físico-químicas, o clomazona apresenta considerável pressão de vapor e potencial de volatilização, estando sujeito à deriva acidental (Senseman, 2007).

A deriva pode ser definida como parte da pulverização agrícola desviada para fora da área alvo, pela ação do vento (Miller, 1993), constituindo-se em uma das principais causas de perdas de herbicidas. A deriva acidental pode ocorrer em função do tamanho da gota, altura da ponta de pulverização, velocidade de operação, condições ambientais (velocidade do vento, temperatura e umidade relativa do ar), volume de aplicação, e ainda, da formulação utilizada. A ocorrência de deriva acidental na aplicação de herbicidas é considerada um sério problema na agricultura, por reduzir a eficiência da aplicação e colocar em risco as culturas instaladas em áreas vizinhas (Yamashita & Guimarães, 2006), além da possível contaminação ambiental.

A aplicação de subdoses, simulando deriva, tem sido utilizada por diversos pesquisadores com a finalidade de avaliação dos eventuais efeitos em culturas sensíveis. Essa técnica foi utilizada por França et al. (2010) para estimar os efeitos do glifosato sobre os teores foliares de nutrientes em três cultivares de cafeeiro. De forma semelhante, Carvalho et al. (2014) avaliou o efeito da deriva simulada do herbicida triclopir e da mistura formulada

triclopir + fluroxipir nas variáveis morfológicas em mudas de clones de eucalipto. No entanto, pouco se sabe a respeito das alterações provocadas pela deriva acidental no metabolismo secundário das plantas.

A deriva acidental de herbicidas nas plantas cultivadas pode provocar aumento da produção de radicais livres, especialmente espécies reativas de oxigênio (EROs) como: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); radical hidroxila ($\cdot OH$); e, oxigênio singlete (1O_2). Estas moléculas, altamente reativas, irão reagir com os lipídios formadores das membranas, resultando em peroxidação lipídica, que, além de formar novos radicais lipídicos, danificam irreversivelmente as membranas celulares (Fleck & Vidal, 2001). A resposta direta do dano às membranas celulares pela peroxidação lipídica é o extravasamento do conteúdo celular para o meio que estiver envolvendo os tecidos danificados (Kruse et al., 2006), desestruturando diversos processos fisiológicos e metabólicos das plantas.

Para combater os danos provocados pelas EROs as plantas desenvolveram dois mecanismos de proteção, um sistema antioxidante enzimático e outro não enzimático (Mittler, 2002). No sistema antioxidante não enzimático está incluída a produção de compostos fenólicos, que são sintetizados pelas plantas em resposta a algum tipo de estresse (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da deriva simulada dos herbicidas glifosato e clomazona sobre variáveis fisiológicas da cultura do tomateiro.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e laboratório da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) no município de Capão do Leão, RS, no período de novembro de 2010 a fevereiro de 2011, em

delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial, sendo o fator A composto por dois herbicidas (glifosato ou clomazona) e o fator B por subdoses do herbicida (0; 12,5; 25; 37,5 e 50% da dose comercial de glifosato 720 g e.a. ha⁻¹ e clomazona 1000 g i.a. ha⁻¹). As unidades experimentais constituíram-se de sacos de polietileno com capacidade volumétrica de 1 L, sendo mantida uma planta de tomate, cultivar Kada Gigante, por unidade experimental.

A deriva foi simulada pela aplicação de subdoses dos herbicidas diretamente sobre as plantas de tomate, quando as mesmas apresentavam cinco folhas verdadeiras. Para aplicação dos herbicidas foi utilizado pulverizador costal, pressurizado a CO₂ e pressão de trabalho de 210 kPa, munido com bicos tipo leque e pontas 110.015, o que proporcionou a aplicação de 120 L ha⁻¹ de calda herbicida.

Amostras foliares foram coletadas 72 horas após a pulverização (HAP), sendo imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e mantidas a temperatura de -80°C até o momento das análises. A avaliação dos efeitos causados pelos herbicidas foi realizada por meio da alteração no metabolismo secundários das plantas.

A determinação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com método descrito por Singleton & Rossi (1965), com modificações. Para a etapa de extração pesou-se 2 g de amostra triturada, diluiu-se em 20 mL de metanol, colocou-se em banho-maria a 25°C, durante 3 horas. Após este período, a amostra foi filtrada com algodão para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com metanol. Para a etapa de quantificação dos fenóis foi retirado 1 mL do extrato obtido e adicionado 10 mL de água ultra-pura e 0,5 mL de Folin-Ciocalteu 2 N, deixando-se reagir por 3 minutos, e após este período foram adicionados 1,5 mL de Na₂CO₃ 20% (m/v), permanecendo no escuro por mais 2

horas. Realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Ultrospec2000 UV/Visível - Pharmacia Biotech) no comprimento de onda de 765 nm. Foi elaborada curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg GAE) por grama de matéria fresca (MF).

Os teores de clorofilas e carotenoides totais foram determinados com amostras de 0,1 g maceradas em almofariz em presença de 5 mL de acetona 80% (v/v). O material foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para balão volumétrico de 20 mL, completando-se esse volume com acetona 80% (v/v). Os teores de clorofila *a*, *b*, totais (*a* + *b*) e de carotenoides totais foram calculados pelo uso das fórmulas de Lichtenthaler (1987) a partir da absorbância da solução obtida por espectrofotometria a 647, 663 e 470 nm, sendo os resultados expressos em mg g⁻¹ de MF.

Os danos celulares nos tecidos das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinados via acúmulo de aldeído malônico (MDA), conforme descrito por Heath & Packer (1968). Para isso, 0,2 g de folhas foram macerados com nitrogênio líquido e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 7830 rpm por 20 minutos. Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v) em ácido tricloroacético 10% (m/v) e incubadas a 90°C por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos. A absorbância foi lida a 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ e os resultados foram expressos em nM MDA g⁻¹ de matéria fresca.

Outra forma de avaliar os danos celulares foi através da permeabilidade relativa das membranas, determinada por meio do extravasamento de eletrólitos conforme descrito por Tarhanen et al. (1999). Para isso, 0,2 g de

amostra foram triturados e lavados três vezes com água ultra-pura para a retirada do conteúdo das células rompidas durante o corte e de outros eletrólitos aderidos às folhas. Após este procedimento, as mesmas foram colocadas em 50 mL de água ultra-pura e deixadas por 6 horas em banho-maria a 25°C. Decorrido esse tempo, a condutância inicial (Ci) foi obtida utilizando-se condutivímetro (Lutron, CD-4301). Posteriormente a essa leitura, as mesmas amostras foram colocadas em estufa a 90°C por 2 horas e feita a segunda leitura (Cf). A permeabilidade relativa foi calculada pela relação $C_i/(C_i+C_f) \times 100$ e o resultado foi expresso em porcentagem.

Os dados foram analisados quanto a sua normalidade e homocedasticidade e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Os efeitos dos herbicidas foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$) e os efeitos das doses por meio de análise de regressão.

Resultados e Discussão

O teste de Shapiro Wilk demonstrou não ser necessária a transformação dos dados. Não houve interação entre os fatores herbicidas e doses, para as variáveis: conteúdo de fenóis totais, teor de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, carotenoides e extravasamento de eletrólitos. Verificou-se interação entre os fatores herbicidas e doses para a variável peroxidação lipídica.

Para a variável teor de fenóis totais, verificou-se somente efeito principal de dose, sendo constatado aumento do conteúdo de compostos fenólicos em função da elevação da dose para ambos herbicidas e não constatou-se diferenças entre doses testadas, sendo superiores a testemunha (Figura 1). Tais resultados possivelmente estão associados aos mecanismos de proteção das plantas aos herbicidas, uma vez que os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxila, o que possibilita sua

atuação como agentes redutores, interrompendo reações de oxidação através da doação de elétrons ou hidrogênios aos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis (Melo et al., 2008).

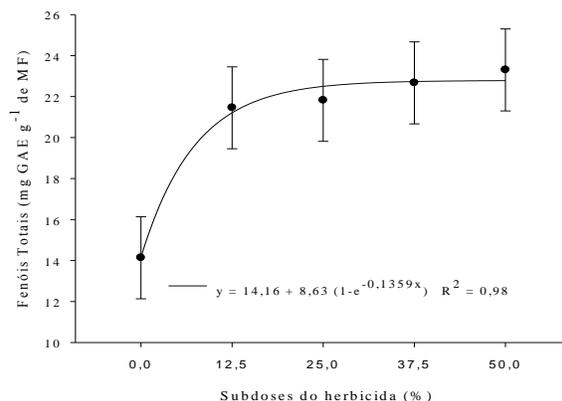


Figura 1. Conteúdo de fenóis totais (mg GAE g⁻¹MF) em função de subdoses crescentes dos herbicidas glifosato e clomazona. As barras verticais representam os intervalos de confiança ($p \leq 0,05$).

Quanto às variáveis clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais, observou-se menor conteúdo nas plantas submetidas à aplicação de glifosato em comparação ao clomazona, o que sugere que este herbicida provoca maiores injúrias as plantas (Tabela 1). Não verificou-se diferença entre herbicidas para a carotenoides e não houve significância estatística em relação às subdoses dos produtos. O teor de clorofila e carotenoides nas folhas indica, entre outros, o nível de dano que determinado estresse pode estar causando à planta, já que a clorose é, normalmente, um dos primeiros sintomas expressos (Catunda et al., 2005). O decréscimo do conteúdo de clorofila e de carotenoides associado à aplicação de herbicidas tem sido relatado em diversas moléculas e diferentes espécies, como *Hordeum vulgare* (Kana et al., 2004), *Myracrodruon urundeuva* (Duarte et al., 2006) e *Ananas comosus* (Catunda et al., 2005).

Tabela 1. Teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides (mg g⁻¹) em função da aplicação de herbicidas.

Herbicida	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenoides
Clomazona	1,35 a ^{1/}	0,78 a	2,13 a	0,28 a
Glifosato	0,99 b	0,52 b	1,51 b	0,22 a
CV (%)	23,3	29,1	22,9	31,2

^{1/} Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste t (p≤0,05).

Apesar do clomazona pertencer ao grupo dos inibidores da síntese de carotenoides, a aplicação de glifosato resultou numericamente em menor síntese ou maior degradação do teor de pigmentos cloroplastídicos. Há relatos sobre os efeitos deletérios do glifosato na síntese de ácido aminolevulínico (ALA), precursor na biossíntese de clorofila (Kitchen et al., 1981). Além disso, a provável inibição da enzima EPSPs, pode estar associada à redução da formação de clorofila, devido à inibição da síntese de AIA (ácido indol-acético). Assim, estruturas são alteradas, provocando danos celulares irreversíveis, como ruptura parcial do cloroplasto e perda de água do retículo endoplasmático rugoso (Silva, 2002). Em

estudo semelhante constatou-se que o glifosato danificou a estrutura dos cloroplastos (Campbell et al., 1976).

As plantas tratadas com glifosato apresentaram maiores teores de MDA, comparativamente as que receberam deriva simulada de clomazona, resultando em maior peroxidação lipídica das membranas (Tabela 2). Houve aumento dos teores de MDA em função do aumento da dose do glifosato, enquanto que para o herbicida clomazona não houve ajuste dos dados ao modelo (Figura 2). O MDA é considerado bom marcador da integridade estrutural das membranas, porque indica o nível de dano aos lipídios pelas reações de oxidação (Ekmekci & Terzioglu, 2005).

Tabela 2. Conteúdo de MDA (nM g⁻¹ MF) em função de subdoses crescentes de herbicidas.

Herbicida	Subdoses do herbicida (%)				
	0	12,5	25	37,5	50
Clomazona	12,8 a ^{2/}	6,75 b	7,59 b	5,49 b	5,83 b
Glifosato	12,8 a	15,57 a	20,38 a	30,46 a	48,51 a
CV (%)	12,8	4,2	2,9	4,6	11,7

^{2/} Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste t (p≤0,05).

A ação do herbicida é normalmente amenizada por defesas naturais da planta ao estresse, destacando-se o papel dos carotenoides, os quais são capazes de reagir com as EROs, dissipando sua energia na forma de calor. Contudo, quando a planta é tratada com herbicida a capacidade protetora dos carotenoides é ultrapassada e a planta sofre peroxidação lipídica (Buchanan et al., 2001), pois o conteúdo de carotenoides é reduzido ao passo que o MDA é aumentado em plantas.

Em relação à variável extravasamento de eletrólitos observou-se valores superiores nas

plantas tratadas com glifosato, ocorrendo aumento nas maiores doses para ambos os herbicidas, sendo verificado diferença somente entre as doses do herbicida e a testemunha (Figura 3). Tais resultados corroboram com o maior teor de compostos fenólicos e com a peroxidação lipídica. O extravasamento de eletrólitos é a última etapa observada em função do estresse oxidativo, sugerindo que houve rompimento da membrana.

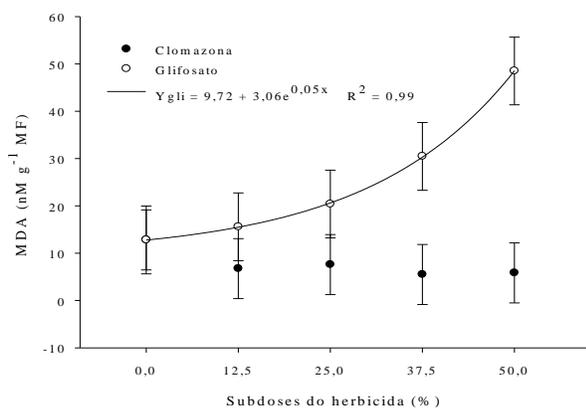


Figura 2. Conteúdo de MDA (nM g^{-1} MF) em função de subdoses crescentes de herbicidas. As barras verticais representam os intervalos de confiança ($p \leq 0,05$).

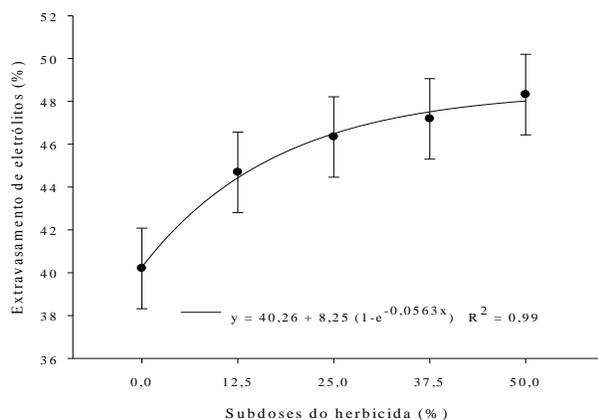


Figura 3. Extravasamento de eletrólitos (%) em função de subdoses crescentes de herbicidas. As barras verticais representam os intervalos de confiança ($p \leq 0,05$).

Conclusões

O conteúdo de fenóis totais, MDA e extravasamento de eletrólitos, em geral, aumenta em função da dose dos herbicidas. O herbicida glifosato resulta em redução dos pigmentos fotossintéticos e ocasiona maior estresse oxidativo na cultura do tomate, comparado ao clomazona.

Referências

ANDRES, A.; MACHADO, S.L.O. Plantas daninhas em arroz irrigado. In: GOMES, A.S.;

MAGALHÃES JR., A.M. (Eds.). **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p.457-546.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; RUSSELL, L.J. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2001. 1367p.

CAMPBELL, W.F.; EVANS, J.O.; REED, S.C. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quack grass mesophyll cells. **Weed Science**, v.24, n.1, p.22-25, 1976.

CARVALHO, G.P. et al. Deriva simulada de triclopyr e fluroxypyr + triclopyr no desenvolvimento de mudas de clones de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v.38, n.1, p.165-173, 2014.

CATUNDA, M.G. et al. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). **Planta Daninha**, v.23, n.1, p.115-121, 2005.

DUARTE, N.F. et al. Seletividade de herbicidas sobre *Myracrodruon urundeuva* (aroeira). **Planta Daninha**, v.24, n.2, p.329-337, 2006.

EKMEKCI, Y.; TERZIOGLU, S. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.66, n.2-3, p.69-81, 2005.

FLECK, N.G.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores do fotossistema 2. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO JR., A. (Eds.). **Herbicidologia**, 2001, p.100-112.

FRANÇA, A.C. et al. Teores de nutrientes em cultivares de café arábica submetidos à deriva de glyphosate. **Planta Daninha**, v.28, n.4, p.877-885, 2010.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, n.1, p.189-198, 1968.

JOHNSON, A.K. et al. Glyphosate spray drift management with drift reducing nozzles and

- adjuvants. **Weed Technology**, v.20, n.4, p.893-897, 2006.
- KANA, R. et al. Effect of herbicide clomazona on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.78, n.3, p.161-170, 2004.
- KITCHEN, L.M.; WITT, W.W.; RIECK, C.E. Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. **Weed Science**, v.29, n.4, p.513-516, 1981.
- KRUSE, N.D. et al. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazona. **Planta Daninha**, v.24, n.2, p.379-390, 2006.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. **Methods of Enzymology**, v.148, n.1, p.350-382, 1987.
- MELO, E.A. et al. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.1, p.67-72, 2008.
- MILLER, P.C.H. Spray drift and its measurement. In: MATTHEWS, G.A.; HISLOP, E. C. **Application technology for crop protection**. Wallingford: CAB International, 1993. p.101-122.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v.7, n.9, p.405-410, 2002.
- NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, n.1, p.369-89, 1992.
- SENSEMAN, A.S. **Herbicide handbook** (9.ed). Lawrence: Weed Science Society of America, 2007, 458p.
- SILVA, M.D. **Diagnóstico da qualidade da água na microbacia Arroio do Pilão**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de
- Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 72f. 2002.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI JR., J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p.144-158, 1965.
- TARHANEN, S. et al. Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* tower deposited heavy metals and acid rain. **Environmental Pollution**, v.104, p.112-121, 1999.
- TIMOSSI, P.C.; DURIGAN, J.C.; LEITE, G.J. Eficácia de glyphosate em plantas de cobertura. **Planta Daninha**, v.24, n.3, p.475-480, 2006.
- YAMASHITA, O.M.; GUIMARÃES, S.C. Deriva simulada de glyphosate em algodoeiro: efeito de dose, cultivar e estágio de desenvolvimento. **Planta Daninha**, v.24, n.4, p.821-826, 2006.