



Sumário

Resíduos de agrotóxicos na água de rios da depressão central do estado do rio grande do sul, brasil

Tissue biochemical alterations of cyprinus carpio exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice field conditions

Sensibilidade do capim-capivara a herbicida

Considerações sobre agrotóxicos relacionados à lavoura de arroz irrigado

Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Residues of pesticides in the water of the Depression Central rivers in the State of Rio Grande do Sul, Brazil

Enio Marchesan^{*} Gerson Meneghetti Sarzi Sartori^I Luis Antonio de Avila^I
Sérgio Luiz de Oliveira Machado^{II} Renato Zanella^{III} Ednei Gilberto Primel^{IV}
Vera Regina Mussoi Macedo^V Marcos Garcia Marchezan^I

RESUMO

A atividade orizícola é conduzida com uso intensivo de agrotóxicos, os quais, dependendo do manejo e das precipitações pluviiais, podem chegar até os rios. O objetivo do trabalho foi determinar resíduos dos herbicidas clomazona, quinclorac, propanil, bentazone, 2,4-D e imazethapyr e dos inseticidas carbofurano e fipronil nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim, situados na Depressão Central do Rio Grande do Sul, nas safras de 2003/04 a 2007/08, com coletas realizadas de novembro a fevereiro (cultivo do arroz). As análises dos herbicidas e do carbofurano foram realizadas por HPLC-DAD, e a análise do fipronil foi realizada por GC-ECD. Na safra 2003/04, em ambos os rios, os herbicidas clomazona, 2,4-D e propanil foram os mais frequentes nas amostras de água. Na safra 2004/05, o quinclorac foi detectado em maior número de amostras, já nas safras 2005/06 e 2006/07 fipronil foi o agrotóxico mais frequente nas amostras nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim. Na safra de 2007/08, houve menor presença de resíduos de agrotóxicos nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim. Há presença de agrotóxicos utilizados na lavoura de arroz nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim durante o período de cultivo de arroz irrigado, destacando-se, entre os analisados, os herbicidas clomazona e quinclorac e o inseticida fipronil.

Palavras-chave: mananciais hídricos, herbicidas, inseticidas, monitoramento.

ABSTRACT

The rice-growing activity is conducted out with intensive use of agrochemicals, which, depending on the management and rainfall can reach rivers. The study aimed to

determine the residues of herbicides clomazone, quinclorac, propanil, bentazone, 2,4-D and imazethapyr and insecticides carbofuran and fipronil in the Vacacaí and Vacacaí-Mirim rivers, located in the Central Depression of Rio Grande do Sul, in the crop of 2003/04 until 2007/08. Samples were collected from November to February (rice growing season). Analysis of herbicides and carbofuran were performed by HPLC-DAD and fipronil by GC-ECD. During 2003/04, in both rivers, the herbicide clomazone, 2,4-D and propanil were the most frequent in water samples. In 2004/05, the quinclorac was detected in many samples and in 2005/06 and 2006/07 season's fipronil was the most common pesticide in the samples in Vacacaí and Vacacaí-Mirim rivers. In the 2007/08 crop, there were less residues of pesticides in Vacacaí and Vacacaí-Mirim rivers. There is presence of pesticides used in rice farming in the Vacacaí and Vacacaí-Mirim rivers during the rice crop, especially among those analyzed, the herbicides clomazone and quinclorac and the insecticide fipronil.

Key words: water sources, herbicides, insecticides, monitoring.

INTRODUÇÃO

Os rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim são importantes para a região da Depressão Central (DC) do Rio Grande do Sul (RS), pois deles é retirada água para irrigação, principalmente para cultivo de arroz, e para o abastecimento da pecuária e de outras criações. A localização das lavouras, em região próxima das

^IDepartamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: emarchezan@terra.com.br. ^{*}Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Defesa Fitossanitária, UFSM, CCR, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), CCNE, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{IV}Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

^VInstituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), EEA, Cachoeirinha, RS, Brasil.

margens de cursos de água, potencializa o risco de contaminação, em razão das descargas naturais ou do manejo das lavouras, exigindo medidas mitigadoras.

Há constante preocupação com a qualidade da água dos mananciais hídricos, visto que estão entre os recursos do ambiente que apresentam maior vulnerabilidade em relação a agrotóxicos de forma geral. Nos rios que tem produção de arroz irrigado em suas bacias hidrográficas, a proximidade das lavouras em relação aos cursos d'água e o volume de água utilizado na irrigação são aspectos importantes que, associados à precipitação pluvial, favorecem o transporte de agrotóxicos das lavouras de arroz irrigado para os mananciais hídricos superficiais (COSTA et al., 2008; MARCHESAN et al., 2007).

Há poucas referências em relação aos limites tolerados de agrotóxicos em cursos de água. Entre as normativas existentes que contemplam agrotóxicos utilizados em lavouras de arroz, encontram-se a Resolução CONAMA (nº 357, de 17 de março de 2005), que estabelece limites para 2,4-D de $4,0\mu\text{g L}^{-1}$, para águas de classe I e II e $30\mu\text{g L}^{-1}$, para águas de classe III. A portaria (nº 518 de 25 de março de 2004) do Ministério da Saúde estabelece limites de $30\mu\text{g L}^{-1}$, para 2,4-D, e $20\mu\text{g L}^{-1}$, para propanil, como padrão de potabilidade. Para a União Europeia, a concentração máxima é $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ para cada agrotóxico e $0,5\mu\text{g L}^{-1}$ para o total de agrotóxicos em águas destinadas ao consumo humano, independente de sua toxicidade (COUNCIL DIRECTIVE, 1980).

Em vista disso, realizou-se o monitoramento dos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim, objetivando detectar e quantificar a presença dos herbicidas clomazona, quincloraque, propanil, bentazona, 2,4-D e imazethapyr e dos inseticidas carbofurano e fipronil.

MATERIAL E MÉTODOS

O monitoramento dos rios foi realizado entre as safras agrícolas de 2003/04 e 2007/08 na área de abrangência da Bacia Hidrográfica dos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim, localizados na Depressão Central do Rio Grande do Sul, possuindo uma área total de $11.085,77\text{km}^2$ (RS, 2007).

Os pontos de coleta, em número de 10, foram os locais mais representativos quanto à drenagem das lavouras. Para o rio Vacacaí, os pontos estão localizados nas seguintes coordenadas geográficas: Passo do Verde ($29^\circ 56' 14,81''\text{S}$ e $53^\circ 42' 43,83''\text{O}$); Passo da Lagoa ($29^\circ 59' 15,85''\text{S}$ e $53^\circ 55' 38,65''\text{O}$); Passo do Rocha ($30^\circ 13' 55,05''\text{S}$ e $53^\circ 59' 08,08''\text{O}$); Rio São Sepé ($29^\circ 59' 00,09''\text{S}$ e $53^\circ 18' 44,92''\text{O}$) e Rio Santa Bárbara ($30^\circ 01' 38,14''\text{S}$ e $53^\circ 11' 21,12''\text{O}$). No rio Vacacaí-Mirim, os pontos foram: Três Barras ($29^\circ 36' 30,06''\text{S}$ e

$53^\circ 41' 56,23''\text{O}$); Arroio do Meio ($29^\circ 40' 14,76''\text{S}$ e $53^\circ 40' 20,48''\text{O}$); RS-287 ($29^\circ 42' 36,71''\text{S}$ e $53^\circ 40' 20,48''\text{O}$); Arroio do Só ($29^\circ 46' 33,13''\text{S}$ e $53^\circ 36' 51,58''\text{O}$) e Restinga Seca ($29^\circ 48' 04,44''\text{S}$ e $53^\circ 22' 08,47''\text{O}$). As coletas foram realizadas entre os meses de novembro e fevereiro, período das aplicações de agrotóxicos e da irrigação das lavouras de arroz, com periodicidade de 15 dias para o rio Vacacaí e 10 dias para o rio Vacacaí-Mirim nas safras 2003/04 a 2005/06, respectivamente. Nas safras 2006/07 e 2007/08, a periodicidade de coletas variou de 20 a 30 dias.

Em cada coleta, utilizou-se uma garrafa de politereftalato de etila (2L), provida de orifícios da metade até a extremidade superior, acoplada a um suporte com peso e a uma corda para integração da água de diferentes profundidades. Em seguida, as amostras de água (1L) foram transferidas para frascos de vidro de cor âmbar, acondicionadas em uma caixa térmica e encaminhadas para a análise no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP) da Universidade Federal de Santa Maria, sendo analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD) (ZANELLA et al., 2003), com exceção do fipronil, que foi determinado por Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD), após pré-concentração por SPE. Os métodos por HPLC-DAD e GC-ECD empregados apresentaram, para todos os agrotóxicos estudados, valores satisfatórios de recuperação entre 81,3 e 112,3%, com valores de precisão entre 1,8 e 14,2%. Para confirmação dos compostos, as amostras que apresentaram resíduos de agrotóxico foram analisadas também por HPLC acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (LC-MS/MS), conforme descrito por CALDAS et al. (2009). O preparo das amostras envolveu a pré-concentração de 250mL de amostra em cartuchos de extração em fase sólida (SPE) contendo 500mg de C₁₈. A eluição dos agrotóxicos foi efetuada com 1mL de metanol.

As análises por HPLC-DAD foram efetuadas em coluna Bondesil C₁₈ (250x4,6mm d.i.; 5 μm), com fase móvel metanol e água pH 3,0 (60:40, v/v), na vazão de $0,8\text{mL min}^{-1}$ e detecção em 220nm. Para as análises por GC-ECD, utilizou-se coluna capilar DB-5 (30m, 0,25mm d.i. e 0,25 μm de espessura de filme), com temperatura do injetor: 280°C ; volume de injeção: $1,0\mu\text{L}$; helio: $1,3\text{mL min}^{-1}$; temperatura do forno da coluna: 80°C (1min), $25^\circ\text{C min}^{-1}$ até 215°C , depois 3°C min^{-1} até 250°C ; e temperatura do detector: 300°C .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se que houve variação entre as safras agrícolas quanto à presença de agrotóxicos nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim (Tabelas 1 e 2). Na safra

Tabela 1 - Concentração de herbicidas e inseticidas na água do rio Vacacaí. Santa Maria, RS. 2009.

Safras	Agrotóxicos	Total de amostras ⁽¹⁾	% AC ⁽²⁾	-----Concentração µg L ⁻¹ -----		
				Mínimo	Média	Máximo
2003/04	clomazona	42	26,2	0,8	2,2	4,7
	quincloraque		0	nd	nd	nd
	propanil		21,4	0,7	2,3	5,4
	bentazona		14,3	0,7	2,3	3,6
	2,4-D		26,2	0,9	1,8	2,7
	Ao menos 1 ⁽³⁾		66,7	-	-	-
2004/05	clomazona	36	38,8	0,2	0,6	1,5
	quincloraque		41,7	0,6	0,9	2,5
	propanil		0	nd	nd	nd
	bentazona		2,7	0,6	0,6	0,6
	2,4-D		2,7	0,4	0,4	0,4
	Ao menos 1 ⁽³⁾		63,9	-	-	-
2005/06	imazethapyr	33	15	0,1	0,1	0,2
	quincloraque		0	nd	nd	nd
	clomazona		3	0,3	0,3	0,3
	carbofurano		21	0,1	0,3	0,4
	fipronil		90	0,05	3,5	16,3
	Ao menos 1 ⁽³⁾		94	-	-	-
2006/07	imazethapyr	30	0	nd	nd	nd
	quincloraque		0	nd	nd	nd
	clomazona		0	nd	nd	nd
	carbofurano		0	nd	nd	nd
	fipronil		80	2,2	6	26,2
	Ao menos 1 ⁽³⁾		80	-	-	-
2007/08	imazethapyr	18	5,5	0,4	0,4	0,4
	quincloraque		0	nd	nd	nd
	clomazona		5,5	0,3	0,3	0,3
	carbofurano		5,5	0,6	0,6	0,6
	fipronil		5,5	0,5	0,5	0,5
	Ao menos 1 ⁽³⁾		16,7	-	-	-

* Limite de Quantificação, em µg L⁻¹: imazethapyr = 0,1; quincloraque = 0,6; carbofurano = 0,1; clomazona = 0,2; fipronil = 0,01; bentazona = 0,2, propanil = 0,1 e 2,4-D = 0,1.

(nd) não detectado

(1) Número total de amostras analisadas;

(2) Percentagem de amostras contaminadas;

(3) Amostras com a presença de pelo menos um agrotóxico.

2003/04, no rio Vacacaí (Tabela1), detectou-se a presença de resíduos de agrotóxicos em 66,7% do total de amostras de água coletadas, sendo clomazona e 2,4-D os mais frequentes, representando 26,2% do total de amostras contaminadas, seguido do propanil, com 21,4%. Nessa mesma safra, no rio Vacacaí-Mirim (Tabela 2), em 58,5% das amostras, detectou-se a presença de resíduos de agrotóxicos, sendo 2,4-D, propanil e clomazona também os mais frequentes.

Na safra de 2004/05, encontrou-se a presença de pelo menos um agrotóxico em 63,9 e 60% das amostras nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim. Os agrotóxicos clomazona e quincloraque foram os mais frequentes nos dois rios, destacando-se o quincloraque. Por outro lado, propanil não foi detectado em nenhuma das amostras.

Em 2005/06, no rio Vacacaí, observou-se a presença de pelo menos um agrotóxico em 94% das

Tabela 2 - Concentração de herbicidas e inseticidas na água do rio Vacacaí-Mirim. Santa Maria, RS. 2009.

Safras	Agrotóxicos	Total de amostras ⁽¹⁾	% AC ⁽²⁾	-----Concentração $\mu\text{g L}^{-1(4)}$ -----		
				Mínimo	Média	Máximo
2003/04	clomazona	65	15,4	0,9	1,9	3,4
	quincloraque		7,7	1,1	2,0	3,3
	propanil		15,4	0,9	3,0	5,2
	bentazona		12,3	0,8	1,7	3,5
	2,4-D		20	0,8	2,2	3,2
	Ao menos 1 ⁽³⁾		58,5	-	-	-
2004/05	clomazona	55	34,5	0,2	0,6	1,7
	quincloraque		36,4	0,6	1,4	4,1
	propanil		0	nd	nd	nd
	bentazona		7,3	0,6	1,3	1,8
	2,4-D		7,3	0,3	1,2	3,4
	Ao menos 1 ⁽³⁾		60	-	-	-
2005/06	imazethapyr	70	12,8	0,1	0,4	1,2
	quincloraque		21,4	0,6	0,8	2,0
	clomazone		2,8	0,2	0,3	0,4
	carbofurano		7,1	0,2	0,5	0,8
	fipronil		87	0,1	3,3	16,4
	Ao menos 1 ⁽³⁾		93	-	-	-
2006/07	imazethapyr	30	0	nd	nd	nd
	quincloraque		0	nd	nd	nd
	clomazona		0	nd	nd	nd
	carbofurano		0	nd	nd	nd
	fipronil		66,6	2,1	7	19,4
	Ao menos 1 ⁽³⁾		66,6	-	-	-
2007/08	imazethapyr	24	8,3	0,4	0,4	0,5
	quincloraque		0	nd	nd	nd
	clomazona		8,3	0,3	0,4	0,6
	carbofurano		4,2	0,6	0,6	0,6
	fipronil		4,2	0,6	0,6	0,6
	Ao menos 1 ⁽³⁾		25	-	-	-

* Limite de Quantificação, em $\mu\text{g L}^{-1}$: imazethapyr = 0,1; quincloraque = 0,6; carbofurano = 0,1; clomazona = 0,2; fipronil = 0,01; bentazona = 0,2, propanil = 0,1 e 2,4-D = 0,1.

(nd) não detectado

(1) Número total de amostras analisadas;

(2) Percentagem de amostras contaminadas;

(3) Amostras com a presença de pelo menos um agrotóxico.

amostras, sendo fipronil, carbofurano e imazethapyr os agrotóxicos que apresentaram maior porcentagem de detecção nas amostras. No rio Vacacaí-Mirim, detectou-se resíduo de pelo menos um agrotóxico em 93,3% das amostras, destacando-se fipronil, pois, além de ser o mais frequente, apresentou maiores concentrações nas amostras.

Na safra de 2006/07, detectou-se pelo menos um agrotóxico em 80 e 66,6% das amostras analisadas

nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim, respectivamente. Nessa safra, também se destaca o fipronil, pois, além de ser o único agrotóxico detectado nas amostras, apresentou elevada concentração. Por fim, na safra 2007/08, foram detectados resíduos de agrotóxicos em apenas 16,7 e 25% das amostras do rio Vacacaí e Vacacaí-Mirim, respectivamente.

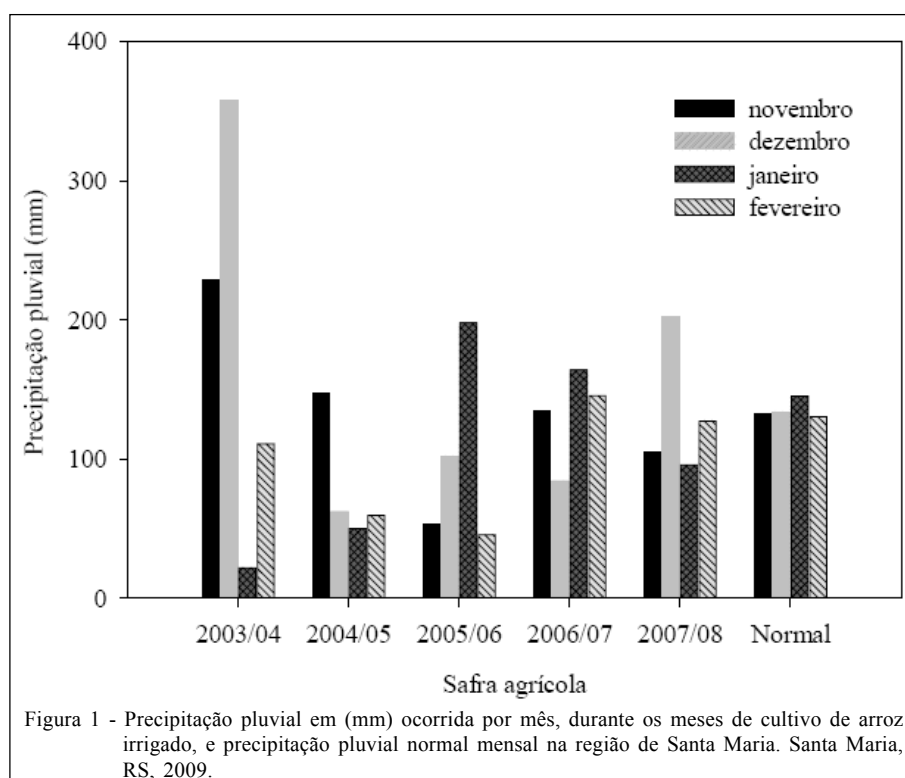
Considerando a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005, e a portaria nº 518, de 25 de

março de 2004, do Ministério da Saúde, nenhuma das amostras ultrapassou as concentrações máximas estabelecidas para 2,4-D e propanil, os agrotóxicos contemplados pelas normativas e investigados neste estudo. Por outro lado, se for considerado o estabelecido pela União Europeia (COUNCIL DIRECTIVE, 1980), 100, 94, 60, 100 e 94% das amostras de água que apresentaram resíduos de agrotóxicos do rio Vacacaí e 100, 98, 70, 100 e 87% das amostras do rio Vacacaí-Mirim nas safras 2003/04 a 2007/08, respectivamente, ultrapassaram a concentração permitida, que é de $0,5\mu\text{g L}^{-1}$.

A elevada frequência do clomazona nas amostras pode ser explicada pela ampla utilização. Esse herbicida pode apresentar persistência de 39 dias no solo e um período de 13 a 31 dias de detecção na lâmina de água de irrigação, o que contribui para a sua permanência no ambiente (SANTOS et al., 2008). Aliado à persistência (MARCHESAN et al., 2007), esse herbicida possui solubilidade de 1100mg L^{-1} em água, considerada alta (SENSEMAN, 2007), fazendo com que seja ainda mais propenso a atingir os corpos de água. Segundo CABRERA et al. (2008), o clomazona apresenta alto potencial de poluição de águas superficiais, bem como de águas subterrâneas, pois é provavelmente transportado na forma dissolvida em água.

De acordo com RAO & WAGENET (1985), quanto maior a hidrossolubilidade da molécula, maior a facilidade de transporte do agrotóxico do momento da aplicação até os cursos d'água. Esse comportamento, associado à ocorrência de chuvas acima da normal em alguns períodos (Figura 1), faz com que aumente a probabilidade de contaminação ambiental, pois estes são facilmente carregados com o movimento das águas (MARCHESAN et al., 2007). Com relação ao propanil, sua lenta degradação pode ter contribuído para ser detectado nas amostras, pois, segundo KONSTANTINOU et al. (2001), a meia-vida desse herbicida é de aproximadamente 55,4 dias. Autores como PRIMEL et al. (2005) relatam que o propanil apresenta grande potencial de poluição de águas de superfície porque pode ser transportado dissolvido em água. Segundo CABRERA et al. (2008), os herbicidas 2,4-D e propanil apresentam, segundo o critério de GOSS, potencial médio de contaminação para as águas superficiais.

A elevada persistência em água do herbicida quincloraque explica sua presença nas amostras coletadas na safra 2004/05. Em trabalho sobre o monitoramento de agrotóxicos na água de mananciais hídricos no Sul do Brasil realizado por GRÜTZMACHER et al. (2008), resíduos de quincloraque foram encontrados em maior frequência



nas amostras. Segundo CUMMING et al. (2002), a elevada persistência desse agrotóxico em água é decorrente de sua baixa solubilidade em água. No entanto, sua inexistência na água do rio Vacacaí e a baixa presença no rio Vacacaí-Mirim, na safra de 2003/04, possivelmente seja reflexo da sua reduzida utilização pelos orizicultores da região nesse período.

A contaminação das amostras com o inseticida fipronil pode estar relacionada com sua ampla utilização e lenta degradação em água, pois, de acordo com COUTINHO et al. (2005), esse produto sofre degradação reduzida em água e sedimentos em condições anaeróbicas, com tempo de meia-vida variando de 116 a 130 dias. De acordo com CABRERA et al. (2008), o fipronil apresenta, segundo o critério de GOSS, potencial médio de contaminação à água superficial. Já a menor ocorrência de carbofurano nas amostras deve-se ao menor uso quando em comparação ao fipronil e, além disso, apresenta baixa solubilidade em água e fácil degradação no meio ambiente (MOREIRA, 2004).

O herbicida imazethapyr, segundo SANTOS et al. (2008), apresenta persistência de 53 dias no solo e um período de 27 dias de detecção na lâmina de irrigação, com meia-vida variando de 1,6 a 6,2 dias, conforme o tratamento. Segundo os autores, nesse período, esse herbicida pode, potencialmente, ser transportado da lavoura para fora do sistema produtivo. Nos Estados Unidos, em trabalho realizado por BATTAGLIN et al. (2000), o herbicida imazethapyr foi encontrado com mais frequência em amostras de águas superficiais e subterrâneas, sendo detectado em 71% das amostras, caracterizando seu potencial de contaminação. A ampla utilização desse herbicida para o controle de arroz-vermelho em lavouras de arroz, especialmente nas bacias hidrográficas dos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim, explicam em parte os resultados encontrados.

A menor ocorrência de agrotóxicos na última safra monitorada pode ser decorrente do não extravasamento da água das lavouras nos meses de novembro (2007) e janeiro (2008), visto que a precipitação pluvial máxima nesse período não ultrapassou 57mm (dados não apresentados). Porém, em 31 de dezembro (2007) e 29 de fevereiro (2008), ocorreu precipitação de 86,8 e 67mm, respectivamente, o que seria suficiente para ocasionar extravasamento da água das lavouras, mas as coletas nesses períodos foram anteriores a essas precipitações (dados não apresentados). A presença e o período de maior ocorrência de agrotóxicos na água dos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim durante o período de cultivo do arroz dependem fundamentalmente da época de aplicação

dos agrotóxicos, do regime pluvial associado ao manejo da irrigação e das características físico-químicas de cada produto.

CONCLUSÕES

Há presença de agrotóxicos (herbicidas e inseticidas) utilizados na lavoura de arroz, nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim, durante o período de cultivo de arroz irrigado.

No período analisado, os herbicidas clomazona e quinclorac e o inseticida fipronil foram os agrotóxicos encontrados com mais frequência nas amostras de água dos rios.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de produtividade em pesquisa para Enio Marchesan, pela bolsa de apoio técnico à pesquisa para Gerson Meneghetti Sarzi Sartori e pelo auxílio financeiro; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS); ao Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA); e à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pelo apoio financeiro concedido para execução do trabalho de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BATTAGLIN, W.A. et al. Occurrence of sulfonylurea, sulphonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Science of the Total Environment*, v.248, p.123-133, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6V78-4007P8H-7-C&_cdi=5836&_user=687358&_orig=search&_coverDate=04%2F05%2F2000&_sk=997519997&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkzS&md5=e9ccd1d3885bf3d5edc143b32100ce1c&ie=/sdtarticle.pdf> Acesso em: 28 dez. 2009. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00536-7.
- BRASIL - CONAMA, Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução CONAMA n.357** de 17 de março de 2005. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2005. 23p.
- BRASIL - **Ministério da Saúde**, portaria n.518, 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. 15p.
- CABRERA, L. et al. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do Estado do RS. *Química Nova*, v.31, n.8, p.1982-1986, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000800012&script=sci_arttext>. Acesso em: 28 dez. 2009. doi: 10.1590/S0100-40422008000800012
- CALDAS, S.S. et al. Pesticide residue determination in groundwater using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detector and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of*

- Brazilian Chemical Society**, 2009, no prelo. Disponível em: <jbcs.sbq.org.br/online/fpapers/09391AR.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2010.
- COSTA, L.L.F. et al. Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região Sul do estado de Santa Catarina através da SPME-GC-ECD. **Química Nova**, v.31, n.1, p.79-83, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000100017&script=sci_arttext>. Acesso em: 28 dez. 2009. doi: 10.1590/S0100-40422008000100017.
- COUNCIL DIRECTIVE. **Relating to the quality of water intended for human consumption**. European Communities, 1980. 19p. Acesso em: 16 mai. 2009. Online. Disponível na Internet: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/consleg/1980/L/01980L0778-19950101-en.pdf>>.
- COUTINHO, C.F.B. et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.15, p.65-72, 2005.
- CUMMING, J.P. et al. Clomazone dissipation in four Tasmanian topsoils. **Weed Science**, v.50, p.405-409, 2002.
- GRÜTZMACHER, D.D. et al. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.6, p.632-637, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662008000600010> Acesso em: 28 dez. 2009. doi: 10.1590/S1415-43662008000600010.
- KONSTANTINOU, I.K. et al. Photodegradation of selected herbicides in various natural waters and soils under environmental conditions. **Journal of Environmental Quality**, v.30, p.121-130, 2001.
- MARCHESAN, E. et al. Rice herbicide monitoring in two brazilian rivers during the rice growing season. **Scientia Agricola**, v.64, n.2, p.131-137, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-90162007000200005&script=sci_arttext&tlng=en>. Acesso em: 28 dez. 2009. doi: 10.1590/S0103-90162007000200005.
- MOREIRA, M.R.S. et al. Monitoramento dos resíduos de carbofurano em área de produção de arroz irrigado – Taubaté, São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.71, p.221-226, 2004.
- PRIMEL, E.G. et al. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do 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. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422005000400010&script=sci_arttext>. Acesso em: 28 dez. 2009. doi: 10.1590/S0100-40422005000400010.
- RAO, P.S.C.; WAGENET, R.J. Spatial variability of pesticides in field soils: methods for data analysis and consequences. **Weed Science**, v.33 (Suppl.2), p.18-24, 1985.
- RS - Governo do Estado. Secretaria Estadual do Meio Ambiente. **Relatório Anual sobre a Situação dos Recursos Hídricos no Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SEMA, 2007. Capturado em 04 abr. 2009. Online. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/Relatorio%20Anual_completo_210207.pdf>.
- SANTOS, F.M dos. et al. Persistência dos herbicidas imazethapyr e clomazone em lâmina de água do arroz irrigado. **Planta Daninha**, v.26, n.4, p.875-881, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582008000400019>. Acesso em: 28 dez. 2009. doi: 10.1590/S0100-83582008000400019.
- SENSEMAN, S.A. **Herbicide handbook**. 9.ed. Lawrence, KS: Weed Science Society of America, 2007. 458p.
- ZANELLA, R. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agriculture waters. **Journal of Separation Science**, v.26, n.9/10, p.935-938, 2003. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/104540447/abstract>>. Acesso em: 28 dez. 2009. doi: 10.1002/jssc.200301309.

Tissue Biochemical Alterations of *Cyprinus carpio* Exposed to Commercial Herbicide Containing Clomazone Under Rice-Field Conditions

Roberta Cattaneo · Bibiana Silveira Moraes · Vania Lucia Loro ·
Alexandra Pretto · Charlene Menezes · Gerson Meneghetti Sarzi Sartori ·
Bárbara Clasen · Luis Antonio de Avila · Enio Marchesan · Renato Zanella

Received: 13 September 2010 / Accepted: 28 March 2011 / Published online: 21 April 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Field and laboratory experiments were performed to evaluate toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to the commercial herbicide clomazone (500 mg l⁻¹). Fish were exposed to 0.5 mg l⁻¹ of the formulated herbicide for 7, 30, and 90 days. Fish were exposed to clomazone in field conditions (7, 30, or 90 days trapped in submersed cages together with rice crops) and in laboratory conditions where the fish were placed in 45-l tanks with tap water only for 7 days. Fish exposed for 7, 30, or 90 days showed no alterations in acetylcholinesterase (AChE) activity under field conditions. Under laboratory conditions, decreased muscle AChE activity was observed only after 7 days of exposure. During the same evaluation period (7 days), oxidative stress parameters changed under both field and laboratory conditions; however, metabolic parameters were altered only under field conditions. Disorders in oxidative stress parameters and metabolism were evident in different tissues up to day 90 after treatment. These overall results show that AChE activity changed only under laboratory conditions.

Oxidative stress, along with metabolic parameters, may be good indicators of herbicide contamination in *C. carpio* under rice-field conditions.

Several environmental pollutants can cause alterations in the biochemical parameters of nontarget organisms. Among these pollutants, pesticides are one of the chemicals known to affect fish by increasing the intracellular formation of reactive oxygen species (ROS). When an imbalance between ROS and the antioxidant system occurs, cells may develop oxidative stress (Nordberg and Arnér 2001). Oxidative stress can also occur as damage to biological systems or failure of antioxidant defense systems. For instance, hydroxyl radical (OH[•]), which is a product of reactions with free radicals, reacts quickly with nearby molecules, leading to oxidative changes in proteins, lipids, and nucleic acid (Cardoso et al. 2006). Lipid peroxidation (LPO) and carbonylation of proteins have both been used to assess the effect of pollutants in aquatic organisms. Different studies have shown that when these parameters are increased, fish are under oxidative stress (Parvez et al. 2006; Almroth et al. 2008). Antioxidant and detoxificant systems in fish include enzymes, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, and glutathione *S*-transferase (GST). Increased activity of these enzymes can indicate disorders that could be indicative of redox alterations related to a possible oxidative stress situation. CAT and GST enzymes have been used as parameters to assess environmental pollutant contamination in fish tissues (Moraes et al. 2007).

Another enzyme that has been used to assess exposure of several contaminants is acetylcholinesterase (AChE). AChE is a key enzyme in cholinergic transmission in the nervous system. The broad function of this enzyme is to

R. Cattaneo · B. S. Moraes · V. L. Loro · A. Pretto ·
C. Menezes · B. Clasen
Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de
Química, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS, Brazil

G. M. S. Sartori · L. A. de Avila (✉) · E. Marchesan
Departamento de Fitossanidade, UFPel, Pelotas, RS, Brazil
e-mail: laavilabr@gmail.com

R. Zanella
Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas,
UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

catalyze the hydrolysis of acetylcholine into acetate and choline in the synaptic cleft (Yi et al. 2006). Herbicides can inhibit or activate this enzyme; however, the effects of activation are little known. Different herbicides classes, such as iso-oxazolidinone (clomazone), dichloropropionanilide (propanil), and sulfonyleurea (metsulfuron-methyl), have caused increased muscle AChE activity in *Cyprinus carpio* exposed for 30 days (Moraes et al. 2007). Miron et al. (2005) found brain AChE activity to be increased in *Rhamdia quelen* exposed to quinclorac herbicide (quinolines group). The most important effect reported for AChE activity is inhibition; in this line, some herbicides, such as glyphosate (Gluszczak et al. 2006) and propanil, cause AChE inhibition in tissues of *Leporinus obtusidens* (Moraes et al. 2009). The herbicides clomazone and glyphosate can also cause disorders in carbohydrate, protein metabolism, and blood parameters (Crestani et al. 2006; Gluszczak et al. 2007). These parameters are secondary indicators of stress. Thus, when they are assessed along with other parameters, we can obtain a good picture of fish poisoning by pesticides.

C. carpio (Cyprinidae) was chosen for this study because the effect of clomazone on fish species, particularly on this one, has been scarcely studied. Another important aspect is that this species is commercially relevant for fisheries in Southern Brazil. This species is resistant and adaptable to different temperatures, and it is frequently cultivated in association with rice crops (Castagnolli and Cyrino 1986).

Clomazone {2-[(2-chlorophenyl)methyl]-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone} is a widely used herbicide in the state of Rio Grande do Sul (RS) in Southern Brazil for weed control in rice. It has high water solubility ($1,100 \text{ mg l}^{-1}$), and its half-life in soil is 24 days (Senseman 2007). The field-dissipation half-life of clomazone, as determined in several types of soil, ranges from 4 to 12 weeks (Zanella et al. 2002). Concerning environmental levels, clomazone residues ($0.31\text{--}1.72 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) were detected in 90% of water samples taken from rivers in rice-producing regions (Zanella et al. 2002). This herbicide has been reported to contaminate surface water in RS (Marchesan et al. 2007) and has also been reported to affect different fish species (Miron et al. 2005; Crestani et al. 2006; Moraes et al. 2011). The concentration used in the present study was chosen according to the recommended use for rice crops.

The evaluation of herbicide effects in fish cultivated in association with rice crops has been scarcely studied and needs better understanding to establish safe pesticide levels for fish health. Thus, the present study aimed to investigate the effects of the commercial formulation of rice herbicide containing clomazone on *C. carpio* in concentrations used in rice fields as well as to determine the possible indicators of fish exposure to this herbicide.

Materials and Methods

Fish

C. carpio of both sexes, weighing $20.0 \pm 1.0 \text{ g}$ and measuring $11.0 \pm 1.0 \text{ cm}$ in length, were obtained from a fish farm (RS, Brazil). Fish were acclimated to laboratory conditions for 10 days in tanks (250 l) before the experiments. They were kept in continuously aerated water with a static system and under a natural photoperiod (12 h light and 12 h dark). After this period, fish were divided in two groups. One group was transferred to a rice paddy, and the other group was transferred to a laboratory tank. Fish were exposed to rice-paddy conditions for 7, 30, and 90 days and to laboratory conditions for 7 days. During the experimental period (90 days), the rice-paddy water had the following average parameters: temperature $24.5 \pm 2.0^\circ\text{C}$, pH 6.5 ± 0.2 , dissolved oxygen $4.21 \pm 2.0 \text{ mg l}^{-1}$, nonionized ammonia $0.8 \pm 0.01 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, and nitrite $0.06 \pm 0.01 \text{ mg l}^{-1}$. Under laboratory conditions, the average water parameters were as follows: temperature $22.1 \pm 1.0^\circ\text{C}$, pH 7.7 ± 0.2 , dissolved oxygen $7.3 \pm 1.0 \text{ mg l}^{-1}$, nonionized ammonia $0.3 \pm 0.01 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, and nitrite $0.04 \pm 0.01 \text{ mg l}^{-1}$. Fish were fed once a day with commercial fish pellets (42% crude protein; Supra, Brazil) during both acclimation and exposure periods.

Chemicals

A commercial formulation of the herbicide clomazone (Gamit 500 CE, FMC Corporation, Philadelphia, EUA) was used in both experiments. Acetylthiocholine (ASCh), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), bovine serum albumin, Triton X-100, hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA), 2-thiobarbituric acid (TBA), and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO).

Experimental Design

Field Experiments

Fish were allocated into two groups (in triplicate) of ten animals/tank (30 fish/treatment). One group was comprised of the control fish, and the other group was comprised of the herbicide-exposed fish, with the latter being exposed to an initial herbicide concentration corresponding to 0.5 mg l^{-1} clomazone for 7, 30, or 90 days. The concentration chosen (0.5 mg l^{-1}) was in accordance with the calculated concentration of clomazone used in rice fields, i.e., $0.4\text{--}0.7 \text{ mg l}^{-1}$, according to Rodrigues and Almeida (2005). The experiment was performed in the rice-paddy field, with the fish trapped in submersed cages measuring

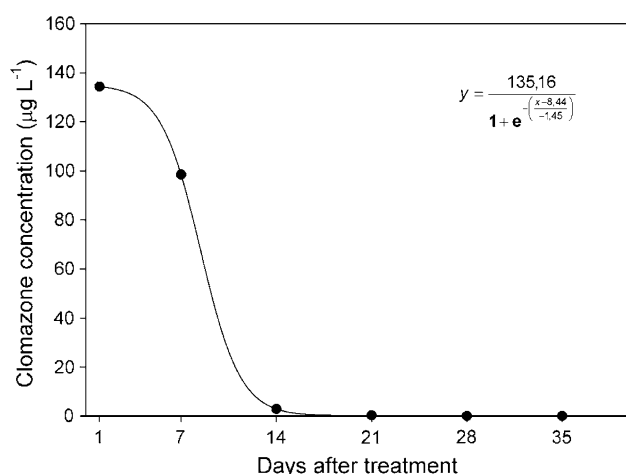


Fig. 1 Clomazone concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) in water of rice-paddy fields

0.30 m (diameter) \times 1.05 m (length). Herbicide concentration in water was monitored from the first day until it could not be detected (Fig. 1). Herbicide was analyzed by high-pressure liquid chromatography using the method described by Zanella et al. (2002). After each exposure time (7, 30, or 90 days), a sample comprising ten individuals was taken from the tanks and submitted to blood and tissue (brain, liver, and white muscle) collection.

Laboratory Experiment

Laboratory experiment was performed in tanks of 45-l capacity (in triplicate) with ten fish each. The herbicide concentrations were the same used in the field condition. The herbicide was added only in the beginning of the experiment without water or herbicide replacement. A filter (with wool acrylic) was used in each tank to remove feeding waste. These filters were cleaned every day. After the experimental period, fish were sampled, and blood and tissues (brain, liver, and white muscle) were collected. All protocols used in this study were approved by the Committee on Ethics and Animal Welfare of the Federal University of Santa Maria (protocol no. 23081.010369/2007-58).

Lipid Peroxidation Assay

Lipid peroxidation was estimated by thiobarbutyric acid reactive substance (TBARS) assay performed by an optically measured MDA reaction with TBA. Liver, muscle, and brain homogenates (100–400 μl) were added, and then trichloroacetic 10% and 0.67% thiobarbituric acid were added to adjust to a final volume of 1.0 ml. The reaction mixture was placed in a microcentrifuge tube and

incubated for 15 min at 95°C. After cooling, it was centrifuged at 5,000 $\times g$ for 15 min, and optical density was measured by spectrophotometer at 532 nm. TBARS levels were expressed as nmol MDA mg^{-1} protein according to Buege and Aust (1978).

Carbonyl Assay

Liver tissue was homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) using a glass homogenizer. Protein carbonyl content was assayed by the method described by Yan et al. (1995) with some modifications. Soluble protein (1.0 ml) was reacted with 10 mM DNPH in 2 N hydrochloric acid. After incubation at room temperature for 1 h in the dark, 0.5 ml denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer [pH 6.8] containing SDS 3.0%), 2.0 ml heptane (99.5%), and 2.0 ml ethanol (99.8%) were added sequentially, vortexed for 40 s, and centrifuged at 10,000 $\times g$ for 15 min. Then the protein isolated from the interface was washed twice by resuspension in ethanol/ethyl acetate (1:1), suspended in 1 ml denaturing buffer, and the carbonyl content measured spectrophotometrically at 370 nm. The assay was performed in duplicate, and two blank tubes incubated with 2 N HCl without DNPH were included for each sample. Total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 M cm^{-1} .

Enzyme Assays

CAT Activity Assay

CAT (EC 1.11.1.6) activity was assayed in supernatant by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesow 1972). Liver tissue was homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5 [1:20 w/v]) and centrifuged at 10,000 $\times g$ for 10 min at 4°C. The assay mixture consisted of 2.0 ml potassium phosphate buffer (50 mM [pH 7.0]), 0.05 ml H_2O_2 (0.3 M), and 0.05 ml homogenate. Change of H_2O_2 absorbance in 60 s was measured at 240 nm. CAT activity was calculated and expressed as $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

GST Assay

GST activity (liver) was measured in supernatant according to Habig et al. (1974) using CDNB as substrate. The formation of S-2-4-dinitrophenyl glutathione (GS-DNB) was monitored by the increase in absorbance at 340 nm against blank. The extinction coefficient used for CDNB was 9.6 mM cm^{-1} . The activity was expressed as $\mu\text{mol GS-DNB min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

AChE Activity Assay

AChE (EC 3.1.1.7) activity was measured using the method described by Ellman et al. (1961) and modified by Miron et al. (2005). Brain and muscle tissues (30 mg) were weighted and homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with sodium phosphate buffer 50 mM (pH 7.2) and Triton X-100 1%. The homogenate was then centrifuged for 10 min at $3,000\times g$ at 5°C, and the supernatant was used as enzyme source. Aliquots of supernatant (50 and 100 μ l [brain and muscle, respectively]) were incubated at 30°C for 2 min with a solution containing 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) and 1 mM DTNB. After the incubation period, the reaction was initiated by the addition of ASCh (0.5 mM). The final volume was 2.0 ml. Absorbance was measured by spectrophotometry (Femto Scan spectrophotometer) at 412 nm for 2 min. Enzyme activity was expressed as μ mol ASCh hydrolyzed $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

Protein Determination

Protein was determined by Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard. Absorbance of samples was measured at 595 nm (Bradford 1976).

Metabolic Parameters

Liver and muscle glycogen were determined by the method described by Bidinotto et al. (1998) after addition of potassium hydroxide (6 N) and ethanol for hydrolysis and precipitation of glycogen. For protein determination, tissues were heated with potassium hydroxide at 100°C and centrifuged at $10,000\times g$ for 10 min. Supernatant was used to estimate the protein level according to the method described by Lowry et al. (1951). For lactate, glucose, and ammonia determination, tissue samples were homogenized by adding 10% trichloroacetic acid (1:20 dilution) using a motor-driven Teflon pestle and centrifuged at $1,000\times g$ for 10 min for flocculation of the proteins. The completely deproteinated supernatant was used for lactate determination using the method described by Harrower and Brown (1972). Glucose was measured according to Park and Johnson (1949), and ammonia was measured according to Verdouw et al. (1978). For amino acid quantification, tissues (liver and muscle) were mechanically disrupted twice by adding 2 ml phosphate buffer 20 mM (pH 7.5), and the homogenates were centrifuged at $1,000\times g$ for 10 min. The neutral supernatant extracts were used for colorimetric amino acid determination according to Spies (1957). Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method with a Bioclin test kit. Plasma was dissolved in 10% trichloroacetic acid (1:20 dilution), and lactate was

estimated according to Harrower and Brown (1972). Plasma total protein levels were measured according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

Statistical Procedures

Comparison of between control and clomazone-exposed groups (field or laboratory) were made using data following normal distribution and analyzed by Student t test (parametric determinations). We compared each control with its respective exposed group (field and laboratory), and $p \leq 0.05$ was considered statistically significant for all statistical analyses.

Results and Discussion

Oxidative Stress

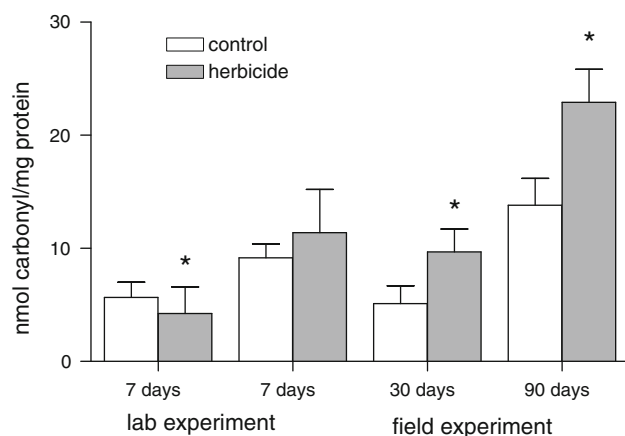
After 7 days of exposure to clomazone in the field, TBARS levels increased in liver and brain (Table 1). These results suggest lipid damage in tissues and could be a good oxidative stress indicator. However, this parameter did not change in muscle tissue. Increased TBARS levels were observed in other fish species on days 4 and 8 after exposure (Crestani et al. 2007; Gluszcak et al. 2007). Other parameters, such as protein carbonyl and GST, did not show alterations under field conditions (Figs. 2, 3). Our study showed decreased CAT activity in the liver of *C. carpio* exposed to clomazone for 7 days under rice-field conditions (Fig. 4). Previous experiments in our laboratory (Crestani et al. 2007; Miron et al. 2008) showed similar results when fish were exposed to clomazone. Moraes et al. (2009) showed the same results in field experiments using clomazone and propanil. In oxidative stress situations induced by herbicides, tissues exhibited different responses by antioxidant defenses. In the present study, oxidative damage caused by clomazone in the field may have suppressed the antioxidant defense represented by CAT, thus causing a loss of compensatory mechanism. Another hypothesis is that the increase in oxyradicals directly affected CAT activity. After 7 days of exposure, brain, liver, and muscle showed increased TBARS levels under laboratory conditions (Table 1). The oxidative damage remained in these tissues only under laboratory exposure. In liver, carbonyl levels decreased, whereas CAT activity increased (Figs. 2, 4). According to some investigators, the decreased protein carbonyl levels may indicate that susceptibility to protein degradation may have been increased by the oxidation of proteins (Almroth et al. 2005). Parvez et al. (2006) also found decreased protein carbonyl levels in liver, kidney, and gills of *Wallago attu* exposed to

Table 1 LPO measured through TBARS levels (nmol MDA mg⁻¹ protein) in brain, liver and muscle of *C. carpio* exposed to a commercial herbicide containing clomazone under laboratory (7 days) and rice-field (7, 30, or 90 days) conditions

Time (d)	Brain		Liver		Muscle	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
Laboratory						
7	3.315 ± 0.55 ^a	4.425 ± 0.73 ^b	2.048 ± 0.25 ^a	2.526 ± 0.18 ^b	0.990 ± 0.15 ^a	1.500 ± 0.21 ^b
Field						
7	4.596 ± 0.49 ^a	7.087 ± 0.86 ^b	1.852 ± 0.36 ^a	7.512 ± 1.31 ^b	1.100 ± 0.18 ^a	1.068 ± 0.13 ^a
30	6.252 ± 0.60 ^a	4.011 ± 0.20 ^b	3.218 ± 0.71 ^a	3.656 ± 0.53 ^a	1.024 ± 0.03 ^a	1.716 ± 0.13 ^b
90	4.884 ± 0.17 ^a	5.070 ± 1.12 ^b	1.992 ± 0.18 ^a	1.788 ± 0.17 ^a	0.862 ± 0.12 ^a	1.410 ± 0.29 ^b

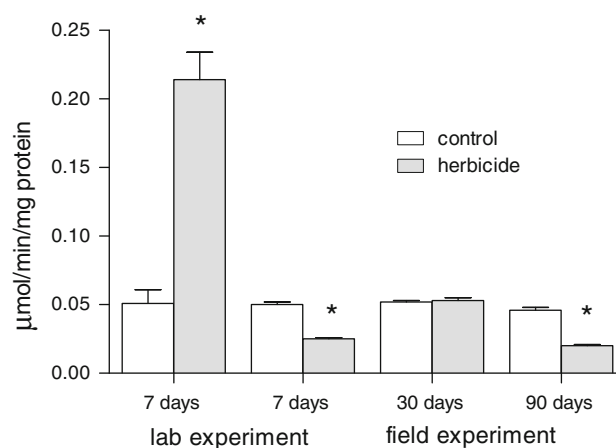
Data are expressed means ± SDs (n = 30)

Different letters indicate significant difference between the control and the herbicide group ($p \leq 0.05$)

**Fig. 2** Liver protein carbonyl levels in *C. carpio* exposed to a commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg l⁻¹) under laboratory (7 days) and rice-field conditions (7, 30 or 90 days). Data are expressed as means ± SDs (n = 30). *Significant difference between the control and the herbicide group ($p \leq 0.05$)

several pollutants at a site on the Yamuna river. Our findings showed a typical response of fish against herbicide toxicity, e.g., increased CAT activity in liver, which probably occurred in response to increased hepatic levels of oxyradicals, such as ROS. Increased TBARS levels in liver could also be related to increased CAT. A significant increase in CAT activity was also observed in some studies after exposure to different pollutants and pesticides (Zhang et al. 2004; Peixoto et al. 2006; Moraes et al. 2007). When *L. obtusidens* was exposed to clomazone and propanil in rice-paddy fields, CAT activity was increased (Moraes et al. 2007). GST enzyme showed no alterations under laboratory or field conditions after 7 days of exposure (Fig. 3).

After 30 days of exposure under field conditions, TBARS levels increased in white muscle, whereas TBARS levels decreased in brain tissue. In liver tissue, no alterations were recorded for this parameter (Table 1). LPO is one of the main processes induced by oxidative stress

**Fig. 3** Liver tissue GST activity in *C. carpio* exposed to a commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg l⁻¹) under laboratory (7 days) and rice-field (7, 30, or 90 days) conditions. Data are expressed as means ± SDs (n = 30). *Significant difference between the control and the herbicide group ($p \leq 0.05$)

(Oruç and Usta 2007). Because LPO is considered a valuable indicator of oxidative damage in cellular components, our results suggest that increased TBARS levels in white muscle of *C. carpio* after exposure to clomazone indicates oxidative stress in this tissue. Moreover, antioxidant defenses were not totally able to effectively scavenge ROS, thus leading to LPO. During this same period, protein carbonyl levels were enhanced (Fig. 2). Thus, protein carbonylation resulting in protein oxidation could be linked to increased TBARS levels due to ROS formation, which in turn could directly attack protein and lead to the carbonyl formation. Such a finding has also been considered by other investigators (Bainy et al. 1996). Our results are in agreement with those of Parvez and Raisuddin (2005), who observed increased protein carbonyl levels in fish (*Channa punctata*) exposed to different pesticides. Increased protein carbonyl levels indicate that normal protein metabolism was disrupted (Almroth et al. 2005). GST is an important

enzyme involved in catalyzing the conjugation of a wide variety of electrophilic substrates to reduce glutathione. Furthermore, it protects the cell against effects of xenobiotics (Ferrari et al. 2007). In the present work, GST activity significantly decreased in liver after exposure to a commercial herbicide formulation containing clomazone (Fig. 3). GST enzyme remained inhibited in hepatic tissue of *C. carpio* after 30 and 90 days of clomazone exposure. Decreased GST activity occurring during this exposure period may suggest a failure of detoxification and the occurrence of oxidative stress. The induction of GST in fish tissues is considered beneficial for handling a stress condition. However, the decrease of such activity is little known. The inhibition of GST activity in hepatic tissue may occur because liver is one of the first organs exposed to toxicant effects. This result is in agreement with that of Ballesteros et al. (2009), who observed decreased GST in gills, liver, and muscle of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan, and with that of Menezes et al. (2011) who found decreased GST in liver of *R. quelen* exposed to Roundup.

After 90 days, TBARS levels increased in brain and remained increased in muscle tissue (Table 1), indicating that a stress condition remained in this fish species after long-term exposure. Liver tissue showed no alteration in TBARS levels. Carbonyl protein increased in liver (Fig. 2), probably due to oxidative stress. This parameter serves as a good biomarker for oxidative stress, especially in the context of environmental contamination. CAT enzyme activity was significantly decreased in liver of fish exposed to clomazone (Fig. 4). Our results are in agreement with those of Dorval and Hontela (2003), who found decreased CAT activity in *Oncorhynchus mykiss* after exposure to

endosulfan. Ballesteros et al. (2009) also observed decreased CAT activity in liver of *Jenynsia multidentata* after endosulfan insecticide exposure. GST enzyme remained inhibited in hepatic tissue of *C. carpio* exposed to clomazone after 90 days. Results concerning oxidative stress and antioxidant parameters could be related to cumulative effects of clomazone because the herbicide was detected in rice-field water until only 14 days after application (Fig. 1), whereas some effects appeared after prolonged exposure (30 and 90 days). Considering that clomazone residues have been found in rice-field crops after only short periods of exposure compared with our experimental period (30 or 90 days), the possibility of the herbicide per se, or some metabolite derivative, causing oxidative damage in fish tissues is an acceptable conclusion.

AChE Enzyme

After 7 days of exposure under field conditions, AChE activity was altered neither in brain nor in muscle compared with controls (Fig. 5a, b). Under laboratory conditions, AChE enzyme in muscle tissue showed inhibition compared with controls (Fig. 5b); however, brain tissue was not altered (Fig. 5a). Under laboratory conditions, Crestani et al. (2007) found that clomazone is a potent brain and muscle AChE inhibitor in *R. quelen*, reaching a maximum of 45–47% inhibition at concentrations of 0.5 or 1.0 mg l⁻¹, respectively. Another study indicated that higher concentrations (5, 10, or 20 mg l⁻¹) of a commercial formulation of clomazone, also under laboratory conditions, caused inhibition of AChE activity in brain and muscle of silver catfish (Miron et al. 2005). The results of our study showed that carp, compared with other species of fish, seem to be more resistant to disrupted AChE activity when exposed to clomazone under field conditions. In addition, clomazone concentrations used in rice fields would not be enough to cause changes in brain AChE. However, muscle tissue showed decreased AChE activity under laboratory conditions. This result clearly showed clomazone interaction with enzymes, perhaps by decreasing enzyme cofactors or by binding with amino acids, thus changing enzyme activity structure. More studies are needed to understand AChE inhibition by clomazone.

After 30 and 90 days of exposure, AChE activity showed no alterations in tissues under field conditions. In another rice-paddy experiment, a 30-day exposure of *L. obtusidens* to clomazone (0.5 mg l⁻¹) showed inhibition of AChE activity in the brain as well as increased AChE activity in muscle (Moraes et al. 2007). In another study concerning 90 days of clomazone exposure, *L. obtusidens* showed decreased AChE activity in both tissues (brain and muscle) (Moraes et al. 2009).

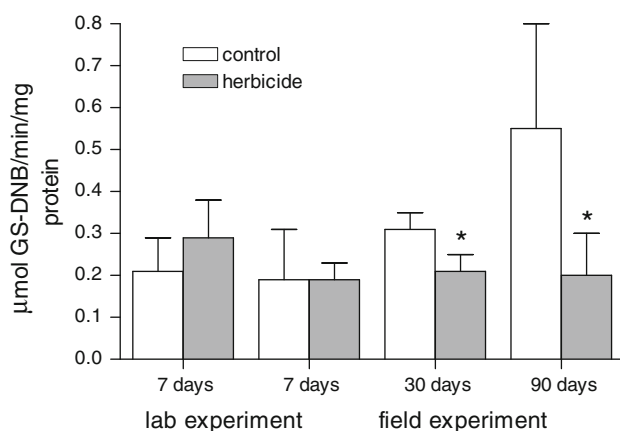


Fig. 4 Liver tissue CAT activity in *C. carpio* exposed to a commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg l⁻¹) under laboratory (7 days) and rice-field (7, 30 or 90 days) conditions. Data are expressed as means ± SDs (n = 30). *Significant difference between the control and the herbicide group (p ≤ 0.05)

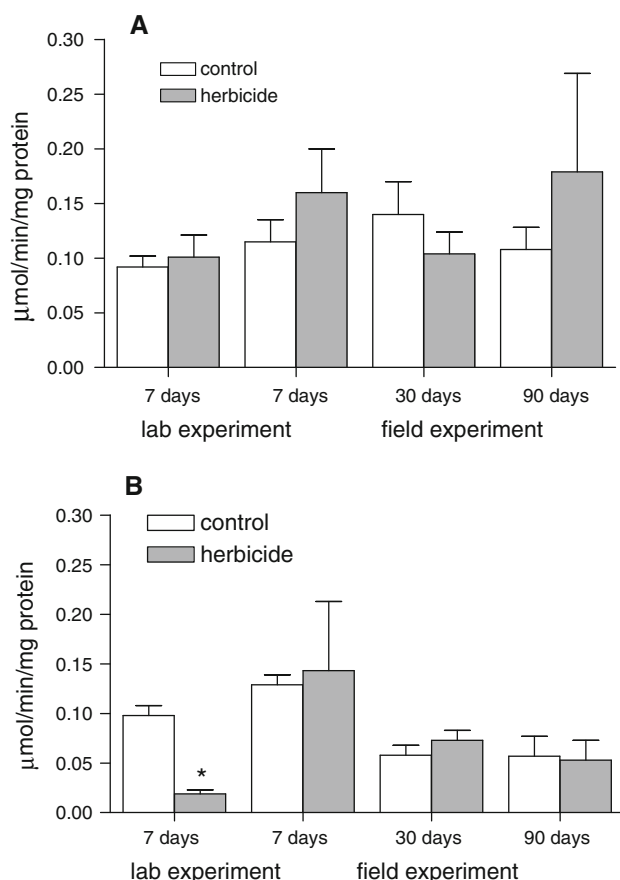


Fig. 5 AChE activity in brain (a) and muscle (b) tissue of *C. carpio* exposed to a commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg l^{-1}) under laboratory (7 days) and rice-field (7, 30 or 90 days) conditions. Data are expressed as means \pm SDs ($n = 30$). *Significant difference between the control and the herbicide group ($p \leq 0.05$)

Inhibition or activation of AChE may affect the process of cholinergic neurotransmission and thus promote undesirable effects in fish. The decreased muscle AChE activity found in our investigation may have been caused by the herbicide molecule and/or the adjuvants used in the formulation due to the absence of clomazone residues in water after 14 days of experimentation (Fig. 1). The absence of effects could indicate that brain and muscle of carp are not affected by the commercial formulation of herbicide containing clomazone.

Metabolic Parameters

It is known that decreased glycogen is the most common response due to a stress situation generated by herbicide exposure. However, after 7 days of exposure to both conditions, liver and muscle tissues showed increased glycogen (Table 2). These results are in disagreement with other studies that have shown the decreased glycogen levels in

tissues as a result of the stress response caused by pesticide exposure (Begum and Vijayaraghavan 1999; Gluszcak et al. 2006; Fonseca et al. 2008). However, Crestani et al. (2006), in a laboratory study, also found increased hepatic glycogen levels in *R. quelen* exposed to clomazone. A similar study considering the same two experimental conditions as our, field and laboratory, showed increased glycogen in liver and muscle after 7 days of herbicide exposure. In addition, this study showed increased muscle glycogen after 7 and 30 days of imazetahpyr and imazapic exposure (Moraes et al. 2011). Increased levels of glycogen in tissues of *C. carpio* suggest that this species stores glycogen by increasing glycogen synthesis. Muscle glucose levels were increased after 7 days of exposure to field conditions and slowly decreased after exposure to laboratory conditions. This difference probably occurs due to some environmental conditions, such as climate change, that may interfere with the metabolism of fish and that does not occur in the laboratory where experimental conditions are controlled.

Under field conditions, lactate levels did not change in liver, whereas they were increased in muscle, indicating an anaerobic metabolism by the increase of lactate to maintain glucose reserves as liver glycogen and muscle glucose. Under laboratory conditions, liver showed increased lactate levels; however, no alteration in muscle was observed. According to Gluszcak et al. (2006), increased lactate also indicates a metabolic disorder and a clear response against energy depletion. Protein levels in liver increased after 7 days, decreased after 30 days, and did not change after 90 days of clomazone exposure under field conditions. Muscle protein showed no change compared with controls under field conditions. However, under laboratory conditions, protein levels did not change in the same tissues (Table 2). These variations in liver protein indicate levels that oxidative stress caused by exposure to the herbicide resulted in a significant variation in the energy requirements of fish directly related to exposure time and conditions of the experiment (i.e., field or laboratory). Crestani et al. (2006) also found increased protein levels in liver of *R. quelen* after 192 h of exposure to clomazone. After exposure to field conditions, the amount of ammonia in liver was increased, but it did not change in muscle. After laboratory exposure, the amount of ammonia was unaltered in liver and increased in muscle tissue. Our results are in agreement with those obtained by Gluszcak et al. (2006, 2007), where fish exposed to glyphosate herbicide showed increased ammonia levels in liver and muscle. Under both experimental conditions, amino acid levels were decreased in muscle tissue. In plasma, there was a decrease in protein and glucose increase under both exposure conditions. Taken together plasma protein decrease and glucose increase could indicate a long time fish response against

Table 2 Liver, muscle, and plasma metabolites of *C. carpio* exposed to a commercial herbicide containing clomazone under laboratory (7 days) and rice-field (7, 30, or 90 days) conditions

Time (d)	Liver		Muscle		Plasma	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
Laboratory						
7						
Glycogen	36.1 ± 4.0 ^a	138.1 ± 20.7 ^b	11.2 ± 2.3 ^a	13.6 ± 2.4 ^b	NM	NM
Glucose	NM	NM	0.7 ± 0.2 ^a	0.6 ± 0.1 ^b	38.5 ± 5.5 ^a	60.5 ± 7.9 ^b
Lactate	9.3 ± 1.3 ^a	12.9 ± 1.0 ^b	29.1 ± 4.4 ^a	26.9 ± 3.6 ^a	6.5 ± 1.2 ^a	10.6 ± 1.5 ^b
Protein	123.6 ± 14.7 ^a	117.9 ± 5.2 ^a	210.6 ± 2.3 ^a	208.0 ± 8.7 ^a	16.9 ± 1.6 ^a	11.8 ± 1.8 ^b
Ammonia	220.1 ± 15.7 ^a	235.2 ± 34.1 ^a	22.5 ± 6.7 ^a	31.6 ± 12.2 ^b	NM	NM
Amino acids	NM	NM	29.7 ± 6.3 ^a	20.3 ± 7.7 ^b	NM	NM
Field						
7						
Glycogen	30.4 ± 9.4 ^a	46.9 ± 10.9 ^b	2.0 ± 0.3 ^a	3.4 ± 0.27 ^b	NM	NM
Glucose	NM	NM	0.6 ± 0.09 ^a	2.1 ± 0.2 ^b	52.6 ± 11.0 ^a	68.0 ± 8.6 ^b
Lactate	15.3 ± 2.1 ^a	16.4 ± 1.3 ^a	20.2 ± 2.3 ^a	23.0 ± 1.5 ^b	2.6 ± 0.05 ^a	1.8 ± 0.7 ^b
Protein	132.8 ± 43.3 ^a	314.5 ± 36.5 ^b	188.4 ± 8.2 ^a	183.7 ± 5.6 ^a	41.3 ± 3.3 ^a	28.4 ± 2.8 ^b
Ammonia	101.4 ± 15.0 ^a	323.6 ± 24.4 ^b	28.7 ± 4.3 ^a	32.2 ± 3.0 ^a	NM	NM
Amino acids	NM	NM	66.1 ± 6.2 ^a	42.3 ± 9.1 ^b	NM	NM
30						
Glycogen	45.2 ± 11.9 ^a	52.7 ± 14.4 ^a	5.2 ± 1.1 ^a	6.6 ± 1.3 ^a	NM	NM
Glucose	NM	NM	1.5 ± 0.5 ^a	0.35 ± 0.1 ^b	34.2 ± 7.1 ^a	55.5 ± 15.9 ^b
Lactate	12.0 ± 0.8 ^a	9.4 ± 1.2 ^b	25.5 ± 4.2 ^a	24.6 ± 1.5 ^a	3.2 ± 0.4 ^a	4.3 ± 0.4 ^b
Protein	121.9 ± 22.5 ^a	87.1 ± 12.4 ^b	235.4 ± 11.7 ^a	238.0 ± 27.7 ^a	41.0 ± 9.0 ^a	47.9 ± 10.0 ^a
Ammonia	112.2 ± 54.4 ^a	38.4 ± 16.6 ^b	30.2 ± 2.4 ^a	26.2 ± 2.3 ^b	NM	NM
Amino acids	NM	NM	50.0 ± 4.3 ^a	47.1 ± 3.6 ^a	NM	NM
90						
Glycogen	24.5 ± 5.5 ^a	37.9 ± 12.8 ^b	6.6 ± 1.5 ^a	6.9 ± 1.8 ^a	NM	NM
Glucose	NM	NM	0.45 ± 0.1 ^a	0.51 ± 0.2 ^a	59.3 ± 4.6 ^a	100.5 ± 14.2 ^b
Lactate	14.0 ± 1.2 ^a	16.2 ± 0.9 ^a	27.0 ± 1.9 ^a	27.7 ± 4.5 ^a	1.4 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.5 ^a
Protein	146.4 ± 32.5 ^a	117.6 ± 21.6 ^a	235.4 ± 32.4 ^a	236.9 ± 35.3 ^a	51.2 ± 6.7 ^a	38.5 ± 6.3 ^b
Ammonia	110.4 ± 13.4 ^a	84.7 ± 8.8 ^b	33.8 ± 9.6 ^a	33.9 ± 4.9 ^a	NM	NM
Amino acids	NM	NM	59.7 ± 7.2 ^a	48.7 ± 9.0 ^b	NM	NM

Data are expressed as means ± SDs ($n = 30$). Glucose, glycogen, and lactate in tissue are expressed as $\mu\text{mol g}^{-1}$ tissue. Protein is expressed as mg g^{-1} tissue or mg ml^{-1} plasma; lactate plasma is expressed as $\mu\text{mol ml}^{-1}$; and glucose is expressed as mg dl^{-1} plasma. Different letters indicate significant difference between the control and the herbicide group ($p \leq 0.05$)

NM not measured

clomazone toxicity. Lactate levels were increased in plasma after exposure under laboratory conditions and decreased in plasma of fish exposed under field conditions. Decreased lactate in plasma is related to hepatic drainage of lactate to maintain hepatic gluconeogenesis. In both conditions of exposure, increased plasmatic glucose levels were observed. The high level of blood glucose is a secondary indicator of stress (Table 2).

After 30 days of exposure, the amount of hepatic and muscular glycogen did not change. In liver, there were decreased lactate levels, but this parameter was not modified in muscle. This decrease may indicate higher

gluconeogenesis adaptation. Fonseca et al. (2008) also observed decreased lactate in liver and muscle of *L. obtusidens* after exposure to 2,4-D herbicide. In liver, protein levels were decreased, but no alterations were detected in muscle. In both tissues, there were decreased ammonia levels. Glucose levels were decreased in muscle of *C. carpio* exposed to clomazone. In plasma, lactate and glucose levels were increased, showing that the disorder remains in the metabolism of fish exposed to herbicide.

After 90 days of exposure, there were increased glycogen levels and decreased ammonia levels in liver, but no alterations were observed in the other parameters.

Increased levels of glycogen after prolonged exposure to herbicide could indicate that fish decreased their consumption of carbohydrate sources, such as glycogen. The consequence of the increased glycogen levels may be either decreased or increased synthesis as shown by Moraes et al. (2011), who reported that liver and muscle glycogen increased after 7 days of laboratory exposure to imazethapyr and imazapic. The same herbicide increased muscle glycogen under field conditions after 30 days of exposure. In muscle tissue, there were only decreased amino acid levels. In plasma, decreased protein levels and a hyperglycemia situation was maintained. These results show that protein oxidation persists and hyperglycemia situation indicated a long time response to clomazone toxicity. Clomazone induced alterations in metabolic parameters probably due to changes in some enzyme cofactors or binding in essential enzymes for metabolism disrupting your function. In fact, fish adopt strategies by which to combat herbicide toxicity, and measurements of metabolic parameters could prove to be good toxicity indicators.

Conclusion

The present study showed that commercial herbicide formulations containing clomazone at rice-paddy field concentrations may cause changes in toxicological and metabolic parameters of *C. carpio* cultivated in the rice paddy. Some of the results obtained under laboratory conditions were similar to those observed under field conditions. However, others were different, contrasting laboratory and field tests. There are long-term effects of the herbicide in fish metabolism. Therefore, these parameters can be used to evaluate clomazone toxicity in fish tissues.

Acknowledgments We thank the Universidade Federal de Santa Maria for support and the facilities; CNPq/CT-HIDRO 552546/2007-09 for financial support; and Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) for the scholarship and the undergraduate student grant.

References

- Almroth BC, Sturve J, Berglund A, Förlin L (2005) Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat Toxicol* 73:171–180
- Almroth BC, Sturve J, Stephensen E, Holth TF, Förlin L (2008) Protein carbonyls and antioxidant defenses in corksiding wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Mar Environ Res* 66:271–277
- Bainy ACD, Saito E, Carvalho PSM, Junqueira VBC (1996) Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat Toxicol* 34:151–162
- Ballesteros ML, Wunderlin DA, Bistoni MA (2009) Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol Environ Safe* 72:199–205
- Begum G, Vijayaraghavan S (1999) Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Environ Res* 80:80–83
- Bidinotto PM, Moraes G, Souza RHS (1998) Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Bol Téc CEPTA* 10:53–60
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 52:302–309
- Cardoso LM, Colombari DSA, Menani JV, De Paula PM, Chianca DA, Colombari E (2006) Espécies reativas de oxigênio no controle neurovegetativo da pressão arterial. *Medicina* 39(1):77–88
- Castagnolli N, Cyrino JEP (1986) *Piscicultura nos trópicos*. Manole LTDA, São Paulo, Brazil
- Crestani M, Menezes C, Gluszcak L, Miron DS, Lazzari R, Duarte MF, Morsch VM et al (2006) Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol Environ Safe* 65:48–55
- Crestani M, Menezes C, Gluszcak L, Miron DS, Spanevello R, Silveira A et al (2007) Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67:2305–2311
- Dorval J, Hontela A (2003) Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol Appl Pharm* 92:191–200
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95
- Ferrari A, Venturino A, Pechén de D'Angelo AM (2007) Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pest Biochem Physiol* 88:134–142
- Fonseca MB, Gluszcak L, Moraes BS, Menezes CC, Pretto A, Tierno MA et al (2008) 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Safe* 69:416–420
- Gluszcak L, Miron DS, Crestani M, Fonseca MB, Pedron FA, Duarte MF et al (2006) Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Safe* 65:237–241
- Gluszcak L, Miron DS, Moraes BS, Simões RR, Schetinger MRC, Morsch VM et al (2007) Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol* 146:519–524
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Harrower JR, Brown CH (1972) Blood lactic acid, a micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J Appl Physiol* 32:709–711
- Lowry DH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Marchesan E, Zanella R, Avila LA, Camargo ER, Machado SLO, Macedo VRM (2007) Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. *Sci Agric* 64:176–180

- Menezes CC, Fonseca MB, Loro VL, Santi A, Cattaneo R, Clasen B, Pretto A, Morsch VM (2011) Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. Arch Environ Contam Toxicol 60(4):665–671
- Miron D, Crestani M, Schetinger MR, Morsch VM, Baldisserotto B, Tierno MA et al (2005) Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). Ecotoxicol Environ Safe 61:398–403
- Miron DS, Pretto A, Crestani M, Glusczak L, Shetinger MR, Loro VL et al (2008) Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). Chemosphere 74:1–5
- Moraes BS, Loro VL, Glusczak L, Pretto A, Menezes C, Marchezan E et al (2007) Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). Chemosphere 68:1597–1601
- Moraes BS, Loro VL, Fonseca MB, Menezes CC, Marcehsan E, Reimche GB et al (2009) Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. Ecotoxicol Environ Safe 95:57–62
- Moraes BS, Clasen B, Loro VL, Pretto A, Toni C, Ávila LA et al (2011) Toxicological responses of *Cyprinus carpio* after exposure to a commercial herbicide containing imazethapyr and imazapic. Ecotoxicol Environ Safe 74:328–335
- Nelson DP, Kiesow LA (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). Anal Biochem 49:474–478
- Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 31:1287–1312
- Oruç EO, Usta D (2007) Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. Environ Toxicol Pharmacol 23:48–55
- Park JT, Johnson MJ (1949) A submicro determination of glucose. J Biol Chem 181:149–151
- Parvez S, Raisuddin S (2005) Protein carbonyls: Novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). Environ Toxicol Pharmacol 20:112–117
- Parvez S, Pandey S, Ali M, Raisuddin S (2006) Biomarkers of oxidative stress in Wallago attu (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. Sci Total Environ 368:627–636
- Peixoto F, Alves-Fernandes D, Santos D, Fontainhas-Fernandes A (2006) Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. Pest Biochem Phys 85:91–96
- Rodrigues BN, Almeida FS (2005) Guide to herbicide, 5th edn. IAPAR, Londrina, pp 461–466
- Senseman SA (2007) Herbicide handbook, 9th edn. Weed Science Society of America, Lawrence
- Spies JR (1957) Colorimetric procedures for amino acids. Method Enzymol 3:467–477
- Verdouw H, Vanechteld CJA, Deckkers EMJ (1978) Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. Water Res 12:399–402
- Yan LJ, Traber MG, Packer L (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. Anal Biochem 228:349–351
- Yi MQ, Liu HX, Shi XY, Liang P, Gao XW (2006) Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. Comp Biochem Physiol C 143:113–116
- Zanella R, Primel EG, Machado SLO, Gonçalves FF, Marchezan E (2002) Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Chromatographia 55:573–577
- Zhang J, Shen H, Wang X, Wu J, Xue Y (2004) Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. Chemosphere 55:167–174

SENSIBILIDADE DO CAPIM-CAPIVARA A HERBICIDAS¹

Sensitivity of West Indian Marsh Grass to Herbicides

SILVA, K.S.², MACHADO, S.L.O.³, AVILA, L.A.⁴, MARCHESAN, E.⁵, ALVES, M.V.P.⁶ e URBAN, L.J.K.⁷

RESUMO - Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação com o objetivo de identificar, através de curvas de dose-resposta, a sensibilidade de plantas jovens e perenizadas de capim-capivara a doses crescentes (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200% da dose recomendada para gramíneas perenes) de cyhalofop-butyl (315 g i.a. ha⁻¹), imazapic + imazapyr (24,5 g e.a. ha⁻¹ + 73,5 g e.a. ha⁻¹), glyphosate (2.160 g e.a. ha⁻¹) e amônio glufosinate (900 g i.a. ha⁻¹). O experimento 1 foi conduzido de janeiro a março de 2010, e o experimento 2, de janeiro de 2010 a janeiro de 2011. Plantas jovens apresentaram maior sensibilidade aos herbicidas amônio glufosinate e cyhalofop-butyl, entretanto, a morte das plantas ocorreu somente quando tratadas com glyphosate e a mistura formulada de imazapic + imazapyr. Em plantas perenizadas, os herbicidas não proporcionaram controle satisfatório.

Palavras-chave: arroz irrigado, controle químico, *Hymenachne amplexicaulis*.

ABSTRACT - Two experiments were conducted under greenhouse conditions to identify, based on dose-response curves, the sensitivity of young and perennial plants of West Indian Marsh grass to increasing doses (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 and 200% of the recommended dose for perennial grasses) of cyhalofop butyl (315 g c.p. ha⁻¹), imazapic + imazapyr (24.5 g c.p. ha⁻¹ + 73.5 g c.p. ha⁻¹), glyphosate (2,160 g c.p. ha⁻¹) and ammonium glufosinate (900 g c.p. ha⁻¹). Experiment I was conducted from January to March 2010 and Experiment II, from January 2010 to January 2011. Young plants showed higher sensitivity to ammonium glufosinate and cyhalofop butyl; however, death occurred only when the plants were treated with glyphosate and a formulated mixture of Imazapic + Imazapyr. The herbicides did not provide satisfactory control against the perennial plants.

Keywords: flooded rice, chemical control, *Hymenachne amplexicaulis*.

INTRODUÇÃO

A cultura do arroz irrigado tem grande importância econômica e social para os Estados do Sul do Brasil. Seu cultivo normalmente ocorre em áreas de várzea ou próximo a corpos hídricos, em ambientes úmidos ou alagados que estão sujeitos, pela condição do relevo, à deposição de sedimentos férteis,

favorecendo, além da cultura, o crescimento de plantas daninhas. Essas espécies, além de competirem diretamente com o arroz por recursos como luz e nutrientes, infestam canais de irrigação e drenagem, dificultando o manejo da irrigação, assim como, ao serem colhidas juntamente com os grãos, são classificadas como impurezas, depreciando a qualidade final do produto.

¹ Recebido para publicação em 21.6.2011 e aprovado em 27.2.2012.

² Eng^a-Agr^a., Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, <keli_agro@yahoo.com.br>; ³ Eng^a-Agr^a., Dr., Professor Titular, Dep. de Defesa Fitossanitária, UFSM, Av. Roraima, 1000, 97105-900 Santa Maria-RS, Brasil, <slomachado@yahoo.com.br>; ⁴ Eng^a-Agr^a., Ph.D., Professor Adjunto, Dep. de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, <laavilabr@gmail.com>; ⁵ Eng^a-Agr^a., Dr., Professor Titular, Dep. de Fitotecnia, UFSM, <emarchezan@terra.com.br>; ⁶ Eng^a-Agr^a., Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UFSM, <marcosvpalves@gmail.com>; ⁷ Aluno de Graduação do Curso de Agronomia, UFSM, <urban_686@hotmail.com>.



Entre essas espécies, *Hymenachne amplexicaulis*, conhecida como capim-capivara, capim-de-açúde ou grama-de-lagoa, forma densas infestações, vegetando áreas úmidas, cursos de água e canais de irrigação e drenagem. Embora seja uma gramínea C_3 , seu crescimento é agressivo, sendo considerada planta daninha problemática de áreas alagadas em diversos países onde foi introduzida, como nos EUA e na Austrália (Csurhes et al., 1999), onde é considerada planta daninha de significância nacional. No Brasil, é relatada como forrageira nas regiões da Amazônia e Pantanal (Dias-Filho, 2005), como infestante de reservatórios de água para a geração de eletricidade no Rio de Janeiro (Martins et al., 2003) e como planta daninha de áreas cultivadas com arroz irrigado no Rio Grande do Sul (Andres & Machado, 2004; Amilibia et al., 2007).

O eficiente metabolismo do nitrogênio, promovendo o crescimento vigoroso de novas folhas e perfilhos (Anten et al., 1998), aliado à boa produção de sementes e estolões (Jiménes & Escobar, 1977; Medina & Motta, 1990), e o grande acúmulo de reservas em seus rizomas explicam o aumento significativo da população dessa planta daninha em áreas úmidas das Américas Central e do Sul, Estados Unidos, México, Austrália, Nova Zelândia e alguns países do continente africano. Em Queensland e Northern Territory, na Austrália, onde foi introduzida como forrageira, a proliferação dessa planta daninha está associada a graves danos ecológicos, como a extinção de espécies de pássaros e plantas, à contaminação ambiental pelos herbicidas utilizados em seu controle e a prejuízos econômicos, como obstrução de leitos navegáveis e infestação de culturas como cana-de-açúcar, com custos substanciais relacionados ao seu controle (Kinnear et al., 2008).

De acordo com Capitanio et al. (2003), a frequência dessa planta daninha nas lavouras de arroz irrigado tem aumentado nos últimos anos. Menezes & Ramirez (2003) relataram dados de produtores da região da Depressão Central do Rio Grande do Sul (RS), onde têm ocorrido infestações maciças de capim-capivara nos arrozais, principalmente junto às várzeas do rio Jacuí. Sua ocorrência também é relatada em lavouras de arroz e canais

de irrigação adjacentes, nos municípios de Formigueiro, Santa Maria e São Vicente do Sul, na mesma região (Sturza et al., 2011). *H. amplexicaulis* cresce rapidamente, impondo sombreamento à cultura; além disso, favorece o acamamento das plantas, pelo grande volume de material vegetal.

Nativa das Américas Central e do Sul, é uma planta perene, que se reproduz por sementes, fragmentos de rizomas e enraizamento dos nós caulinares basais (Csurhes et al., 1999). Práticas de manejo como a manutenção do solo inundado no período de entressafra, redução das operações de preparo, ou preparo com solo úmido, e utilização de herbicidas com baixa eficiência para plantas daninhas perenes têm favorecido o aumento e a dispersão de plantas de capim-capivara pelas várzeas gaúchas. Apresenta ainda elevada capacidade de alongar rapidamente as hastes e formar raízes adventícias quando em áreas alagadas, além de possuir aerênquimas nos tecidos das hastes, folhas e raízes (Kibbler & Bahnisch, 1999).

Para determinar a eficiência de herbicidas, parâmetros como mortalidade de plantas, redução da biomassa e rebrotamento têm sido utilizados por pesquisadores na Austrália. Em estudos preliminares, os herbicidas haloxyfop-methyl, fluazifop-p-buthyl, imazapyr, hexazinone e glyphosate têm-se destacado (Charleston, 2006), porém com informações vagas e divergentes quanto ao controle, devido principalmente a diferenças no estágio de desenvolvimento, ambiente (aquático ou terrestre), proporções do dossel no momento da aplicação, além de a maioria das informações estar direcionada para áreas não agrícolas.

Devido a essas características, estratégias eficazes para o controle de *H. amplexicaulis* são limitadas e a sua localização, em áreas sujeitas à deposição de nutrientes, agrava as dificuldades de controle, por favorecer o crescimento vegetativo e acúmulo de reservas pelas plantas. No Brasil, não há herbicidas registrados para o controle dessa planta daninha (Brasil, 2012), e os dados encontrados na literatura, além de escassos e restritos a poucos herbicidas, divergem quanto às doses e ao controle obtido.

Assim, estudos são necessários a fim de determinar a eficiência de herbicidas, em diversas doses, no controle de capim-capivara em diferentes estádios de desenvolvimento situação comumente constatada em campo. Este trabalho teve por objetivo identificar, através de curvas de dose-resposta, a sensibilidade de plantas jovens e perenizadas de *H. amplexicaulis* a diferentes doses de herbicidas, quantificada pelos percentuais de controle e redução da biomassa seca.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação. O experimento 1 foi conduzido de janeiro a março de 2010, utilizando vasos de polietileno de 2 L de capacidade, e o experimento 2, de janeiro de 2010 a janeiro de 2011, usando vasos de 15 L de capacidade, ambos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para ambos os ensaios, as mudas de capim-capivara, provenientes do enraizamento de nós caulinares basais, foram coletadas em infestações estabelecidas em lavoura de arroz irrigado, no município de Formigueiro, RS.

Os vasos foram preenchidos com solo, previamente peneirado e adubado conforme as recomendações de adubação para a cultura do arroz irrigado (Reunião..., 2010). O solo, um Planossolo Hidromórfico eutrófico arênico, de textura média, foi coletado em área de várzea, na profundidade de 0-10 cm. A análise

química do solo determinou $\text{pH}_{\text{água}(1:1)} = 4,7$; $\text{P} = 9,3 \text{ mg dm}^{-3}$; $\text{K} = 56 \text{ mg dm}^{-3}$; argila = 19%; $\text{MO} = 1,4\%$; $\text{Ca} = 2,5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $\text{Mg} = 0,8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; e $\text{Al} = 0,9 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$.

No experimento 1, a aplicação dos herbicidas (Tabela 1) foi feita em 6 de março de 2010, quando as plantas se encontravam em pleno desenvolvimento vegetativo, com o colmo principal apresentando de três a quatro folhas desenvolvidas e, em média, três perfilhos pequenos por planta, utilizando-se um pulverizador costal pressurizado a CO_2 , equipado com pontas do tipo leque (110015), com volume de calda equivalente a 167 L ha^{-1} . A temperatura média no momento da aplicação foi de $22,8^\circ\text{C}$, e a umidade relativa média do ar, de 62,5%. Após 24 horas, os vasos foram irrigados, sendo mantidos com lâmina de água até o término do experimento, aos 21 dias após a aplicação (DAA) dos herbicidas.

No experimento 2, três plantas de *H. amplexicaulis* foram transplantadas em cada vaso, sendo realizadas duas adubações: a primeira, no preparo do solo, previamente ao transplante, e a segunda, em outubro de 2010, no início da nova estação de crescimento. Nesse ensaio, devido à restrição de espaço, os tratamentos foram compostos apenas por glyphosate e pela mistura formulada de imazapic e imazapyr. A pulverização foi realizada em 16 de dezembro de 2010, quando as plantas perenizadas, com estolões e estruturas de reservas (rizomas) bem desenvolvidos,

Tabela 1 - Tratamentos utilizados nos experimentos 1 e 2, para controle de plantas jovens e perenizadas de *Hymenachne amplexicaulis*. Santa Maria-RS, 2010

Herbicida	Dose aplicada								
	0	25 ^{5/}	50	75	100	125	150	175	200
Experimento 1 - Plantas jovens									
Cyhalofop-butyl ^{1/}	0	0,44 ^{6/}	0,88	1,31	1,75	2,19	2,62	3,06	3,50
Imazapic + imazapyr ^{2/}	0	35,00 ^{7/}	70,00	105,00	140,00	175,00	210,00	245,00	280,00
Glyphosate ^{3/}	0	1,12	2,25	3,38	4,50	5,62	6,75	7,88	9,00
Amônio glufosinate ^{4/}	0	1,12	2,25	3,38	4,50	5,62	6,75	7,88	9,00
Experimento 2 - Plantas perenizadas									
Imazapic + imazapyr	0	35,00	70,00	105,00	140,00	175,00	210,00	245,00	280,00
Glyphosate	0	1,12	2,25	3,38	4,5	5,62	6,75	7,88	9,00

^{1/} 180 g i.a. L^{-1} . ^{2/} 175 g e.a. kg^{-1} + 525 g e.a. kg^{-1} . ^{3/} 480 g e.a. L^{-1} . ^{4/} 200 g i.a. L^{-1} . ^{5/} Percentual da dose-referência recomendada para o controle de gramíneas perenes. ^{6/} Cyhalofop-butyl, glyphosate e amônio glufosinate – doses expressas em L p.c. ha^{-1} . ^{7/} Imazapic + imazapyr – doses expressas em g p.c. ha^{-1} .



apresentavam novos perfilhos, com três a quatro folhas.

Utilizou-se o mesmo pulverizador, com volume de calda equivalente a 200 L ha⁻¹, devido à grande quantidade de material vegetal por pote. A temperatura média no momento da aplicação foi de 25,3 °C, e a umidade relativa média do ar, de 68,9%. As plantas, irrigadas 24 horas após o tratamento, foram conduzidas sob irrigação, com lâmina d'água até os 35 DAA. Os vasos, em ambos os experimentos, tiveram sua localização alterada de forma aleatória a cada sete dias.

As avaliações de controle, efetuadas por dois avaliadores independentes, foram realizadas aos 7, 14 e 21 DAA (experimento 1), quando houve 100% de controle para alguns tratamentos, e aos 7, 14, 21, 28 e 35 DAA (experimento 2). O efeito dos herbicidas sobre as plantas foi determinado por avaliações visuais, com base em escala percentual, em que 0 equivaleu à ausência de injúrias e 100%, à morte das plantas (Frans & Crowley, 1986).

Ao final das avaliações de controle, realizou-se a coleta das plantas, para determinação da biomassa verde e, após a secagem em estufa a 70 °C, da biomassa seca; entretanto, foram utilizados somente os dados da variável biomassa seca, pois a biomassa verde apresentou

grande variabilidade. Os resultados de biomassa da matéria seca da parte aérea foram transformados em porcentagem da testemunha. Os dados foram analisados quanto à homocedasticidade e à normalidade e submetidos à análise de variância. Para avaliação dos efeitos de dose, foram realizadas análises de regressão, utilizando o modelo log-logístico proposto por Seefeldt et al. (1995), sendo os valores estimados para o C₅₀ e BS₅₀ expressos em porcentagem das doses utilizadas como referência, para fins de comparação entre os herbicidas utilizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 - Plantas jovens

As plantas de *Hymenachne amplexicaulis* manifestaram distinta sensibilidade aos herbicidas utilizados, porém apresentaram maiores percentuais de controle e redução da biomassa seca com o aumento das doses (Figura 1). Quando comparados os tratamentos, os herbicidas amônio glufosinate e cyhalofop-butyl promoveram maiores percentuais de controle e redução da biomassa seca em menores doses do que o glyphosate e a mistura formulada de imazapic e imazapyr. Entretanto, no intervalo de doses testado, somente os dois últimos causaram a morte das plantas.

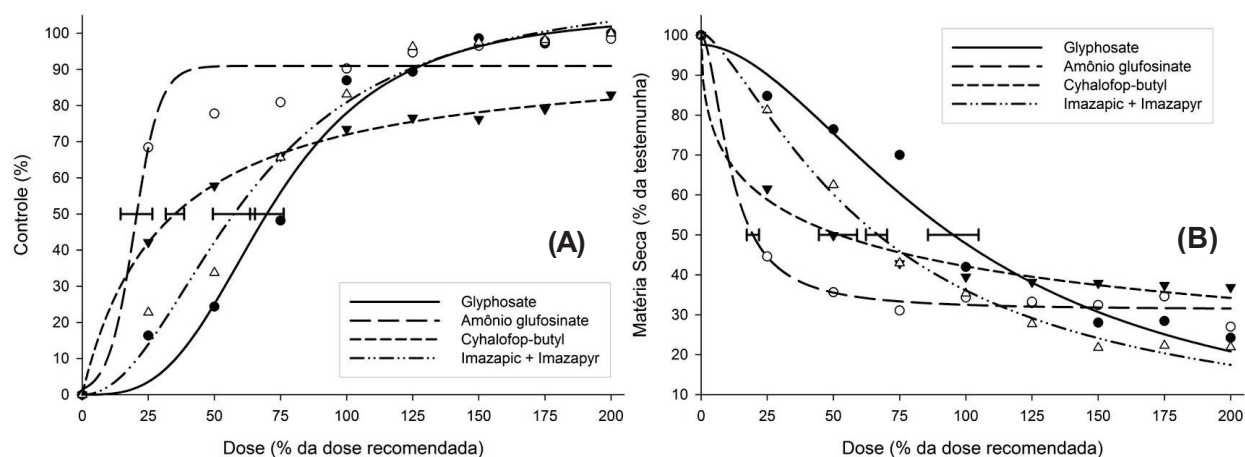


Figura 1 - Percentual de controle (A) e redução da biomassa seca (B) de plantas jovens de *Hymenachne amplexicaulis*, aos 21 DAA, por diferentes doses dos herbicidas glyphosate (480 g e.a. L⁻¹), amônio glufosinate (200 g i.a. L⁻¹), cyhalofop-butyl (180 g i.a. L⁻¹) e da mistura formulada de imazapic (175 g i.a. kg⁻¹) e imazapyr (525 g i.a. kg⁻¹). Santa Maria-RS, 2010. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro da dose que causa 50% de controle (C₅₀) e de redução da biomassa seca (BS₅₀). Santa Maria-RS, 2010.

Os resultados de controle proporcionados pelo cyhalofop-butyl foram superiores aos relatados por Capitão et al. (2003), em ensaio conduzido em campo, com infestação preestabelecida, em que 1,5 L p.c. ha⁻¹ proporcionou controle de 62%, aos 15 DAA. Entretanto, aos 30 e 45 DAA, houve gradual recuperação das plantas, reduzindo os percentuais de controle para 54 e 52,5%, respectivamente. Ao avaliar o controle decorrente da aplicação desse herbicida em infestação estabelecida após o preparo do solo, Menezes & Ramirez (2003) relataram, para doses de 0,5; 0,75; 1,0; e 1,25 L p.c. ha⁻¹, controle de 90, 98, 98 e 100%, respectivamente, aos 30 DAA.

A divergência entre os resultados de controle de capim-capivara pelo cyhalofop-butyl pode ser explicada, entre outras causas, pela diferente quantidade de reservas e estágio fenológico no momento da aplicação, entre os experimentos mencionados. O estágio juvenil, de três a quatro folhas, assim como a fragmentação das plantas para o transplante, o que também ocorre após sucessivas gradagens, nas operações de preparo do solo, tornam as plantas mais sensíveis ao herbicida, que atua nos pontos de crescimento. Segundo Jordan et al. (1997), quando a aplicação de herbicidas é feita com as plantas daninhas nos estádios de uma a três folhas (pós-inicial), a eficiência aumenta, proporcionando nível aceitável de controle.

As plantas manifestaram elevada sensibilidade ao amônio glufosinate, desenvolvendo severa necrose das folhas já aos 7 DAA, com maiores percentuais de controle em menores doses, com C₅₀ de apenas 20% (Tabela 2); contudo, nas doses utilizadas, ocorreu a morte dos perfilhos jovens e injúrias severas na planta-mãe (colmo principal), mas não houve morte total de plantas, com início do rebrotamento já aos 21 DAA, quando do encerramento do experimento. Essa sensibilidade ao glufosinato foi confirmada pelos percentuais de biomassa seca, com significativa redução da biomassa em doses baixas (BS₅₀ = 11%), bem abaixo da dose-referência, mas sem resposta com o aumento da quantidade de herbicida.

O amônio glufosinate provoca o acúmulo de amônia nas plantas tratadas, devido à inibição da ação da enzima glutamina sintetase, a qual é responsável pela conversão de

glutamato mais a amônia em glutamina (Wendler et al., 1992), causando lesões foliares, como amarelecimento e necrose, e provocando a morte em até duas semanas. Por não translocar nas plantas, sua ação está limitada aos locais de contato com o tecido vegetal, exigindo maior qualidade da aplicação; em *H. amplexicaulis*, sua ação restrita pode ser atribuída à rápida recuperação das plantas.

Apesar de herbicidas com comportamentos diferentes – o glyphosate – de ação total, e a mistura formulada de imazapic e imazapyr, seletiva para cultivares de arroz irrigado portadores da tecnologia Clearfield® –, as plantas jovens de *H. amplexicaulis* apresentaram similar sensibilidade aos ativos, que causaram a morte das plantas, com 176 e 171% das doses-referência utilizadas para esses produtos, respectivamente (Tabela 3). Todos os herbicidas reduziram a biomassa seca das plantas em relação à testemunha; o glyphosate e o imazapic + imazapyr ocasionaram os maiores percentuais de redução.

O glyphosate transloca-se no floema seguindo a rota dos produtos da fotossíntese, das folhas fotossinteticamente ativas, em direção às partes em crescimento, para manutenção do metabolismo e/ou formação de produtos de reserva (Hetherington et al., 1998); assim, o estágio fenológico das plantas, pleno desenvolvimento vegetativo e início da formação de rizomas, teria favorecido o controle por esse herbicida.

Experimento 2 - Plantas perenizadas

Os herbicidas glyphosate e a mistura formulada de imazapic + imazapyr, por apresentarem maior controle das plantas jovens, foram reavaliados em plantas de capim-capivara cultivadas por aproximadamente um ano. Dentro do intervalo de doses testado, somente o glyphosate proporcionou percentuais de controle de 50% (Figura 2), com C₅₀ = 192 %, porém com BS₅₀ de 218% da dose-referência, com sintomas evoluindo de clorose, nas avaliações iniciais, até necrose, aos 35 DAA, mas com rebrotamento das plantas. Na Austrália, Charleston (2006) relata a utilização de até 5.040 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate (14 L p.c. ha⁻¹) ou 386 g i.a. ha⁻¹ de haloxyfop-methyl (0,77 L p.c. ha⁻¹) para



Tabela 2 - Parâmetros estimados para as equações de resposta de plantas jovens de *Hymenachne amplexicaulis* às doses dos herbicidas cyhalofop-butyl (180 g i.a. L⁻¹), imazapic (175 g e.a. kg⁻¹) + imazapyr (525 g e.a. kg⁻¹), glyphosate (480 g e.a. L⁻¹) e amônio glufosinate (200 g i.a. L⁻¹). Santa Maria-RS, 2010

Herbicida	y ₀	a	b	x ₀	R ²	P	Equação
Parâmetros estimados para controle							
Cyhalofop-butyl	-	94,5196	-0,9960	31,2223 ^{2/}	0,9974	0,0001	Log ^{3/}
		(5,2423) ^{1/}	(0,1360)	(3,4855)			
Imazapic + Imazapyr	-	112,8304	-2,0854	64,0264	0,9765	0,0001	Log
		(10,1511)	(0,4469)	(7,9381)			
Glyphosate	-	105,9784	-3,1637	72,3828	0,9666	0,0001	Log
		(8,2681)	(0,8037)	(6,3613)			
Amônio glufosinate	-	90,9813	4,8301	19,7108	0,9279	0,0002	Sig ^{4/}
		(3,1714)	(5,2462)	(6,0226)			
Parâmetros estimados para biomassa seca							
Cyhalofop-butyl	-	100,1585	0,4856	51,6940 ^{5/}	0,9865	0,0001	Log
		(2,3955)	(0,0549)	(7,2004)			
Imazapic + Imazapyr	-	100,6326	1,4128	66,2532	0,9905	0,0001	Log
		(2,7217)	(0,0966)	(3,9889)			
Glyphosate	-	97,6300	1,8233	97,8329	0,9561	0,0001	Log
		(5,3162)	(0,2966)	(9,5532)			
Amônio glufosinate	31,2122	68,7894	1,8421	11,5251	0,9843	0,0001	Log ^{6/}
	(2,3207)	(3,6496)	(1,2624)	(5,9950)			

^{1/} Valores entre parênteses correspondem ao erro-padrão do parâmetro.

^{2/} Dose do herbicida (percentual da dose usada como referência) que causa 50% de controle (C₅₀) em plantas de *H. amplexicaulis*.

^{3/} Equação logística de três parâmetros
$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{x_0} \right)^b}$$

^{4/} Equação sigmoidal de três parâmetros
$$y = \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{x-x_0}{b} \right)}}$$

^{5/} Dose do herbicida (percentual da dose usada como referência) que causa 50% de redução de massa da biomassa seca (BS₅₀) da parte

aérea de plantas de *H. amplexicaulis*
$$y = y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{x_0} \right)^b}$$

^{6/} Equação logística de quatro parâmetros.

controle de *H. amplexicaulis* em áreas não agrícolas.

A mistura de imazapic e imazapyr, mesmo na dose de 200%, causou leves injúrias nas folhas e colmos, com sintomas como clorose, que evoluiu para nervuras arroxeadas, e

Tabela 3 - Doses de cyhalofop-butyl, imazapic + imazapyr, glyphosate e amônio glufosinate necessárias para os respectivos controles, calculadas por meio do modelo logístico ajustado para os dados das curvas de dose-resposta de plantas jovens de *Hymenachne amplexicaulis*. Santa Maria-RS, 2011

Herbicida	Dose-referência ^{1/}	C ₅₀ ^{2/}	C ₁₀₀ ^{3/}
	(L p.c. ha ⁻¹ ou g p.c. ha ⁻¹)		
Cyhalofop-butyl	1,75	0,61	^{4/}
Imazapic + Imazapyr	140,00	49,10	240,0
Glyphosate	4,50	3,14	7,9
Amônio glufosinate	4,50	0,89	-

^{1/} Correspondente à dose de 100%. ^{2/} Dose que proporcionou 50% de controle. ^{3/} Dose a partir da qual ocorreu morte das plantas.

^{4/} Nas doses testadas, não ocasionou morte das plantas.

necrose, principalmente do ápice foliar, porém sem causar a morte das plantas. Os valores do C₅₀ e do BS₅₀, 310 e 351% (Tabela 4), respectivamente superiores aos encontrados para o glyphosate, evidenciam a menor

sensibilidade das plantas perenizadas de capim-capivara ao herbicida, contudo, a ausência de controle pode estar limitada às doses utilizadas no experimento, para ambos os herbicidas.

A maior redução da biomassa seca das plantas de capim-capivara tratadas com glyphosate, no período avaliado, pode ser explicada pela maior velocidade de controle desse herbicida, se comparado à mistura formulada utilizada, pois ele interrompe o ciclo do carbono no cloroplasto, causando redução na síntese de carboidratos e diminuindo o transporte destes para os drenos (Satchivi et al., 2000). Segundo Taiz & Zeiger (2004), o glyphosate se movimenta muito rápido pela planta, e esse movimento está associado às velocidades de transporte de açúcares no floema, que são elevadas. Em contrapartida, ao avaliar o controle de *Brachiaria subquadriflora* e *B. mutica*, Carbonari et al. (2003) constataram que o controle proporcionado pelo imazapyr é bastante lento, porém sempre crescente.

De acordo com Charleston (2006), na Austrália, o glyphosate é o principal herbicida usado no controle químico de *H. amplexicaulis*, porém sua eficiência pode ser variável – e em alguns casos, de apenas 50%; assim, as infestações são monitoradas e novamente tratadas a cada três meses. Segundo Diaz et al. (2003), pesquisas conduzidas na Universidade da Flórida mostraram que 4.260 g e.a. ha⁻¹ de

glyphosate ou 1.121 g i.a. ha⁻¹ de imazapyr promoveram controle superior a 90%, três meses após o tratamento. Ainda segundo esses autores, quando tratadas com glyphosate, verifica-se rebrotamento das plantas, ao passo que o controle proporcionado por imazapyr é mais duradouro, podendo chegar a um ano ou mais, conforme condições ambientais (Ismail & Ahmad, 1994).

Os resultados comprovam a necessidade de doses maiores do que o normalmente recomendado para gramíneas perenes, para controle satisfatório do capim-capivara, e permitem concluir que plantas de *H. amplexicaulis* em estádios juvenis de desenvolvimento são sensíveis aos herbicidas testados. Entretanto, nas doses avaliadas, somente o glyphosate e a mistura formulada de imazapic e imazapyr causam a morte das plantas. Em plantas perenizadas, as doses testadas desses herbicidas não proporcionam controle satisfatório, evidenciando a dificuldade de controle dessa planta daninha quando em estádios avançados de desenvolvimento.

Sumarizando os resultados deste estudo, a utilização de doses acima das recomendadas a fim de proporcionar maiores percentuais de controle não se justifica. Assim, a integração de práticas de manejo que desfavoreçam o estabelecimento de plantas de capim-capivara – como drenagem do solo na entressafra, preparo com solo seco, controle em estádios

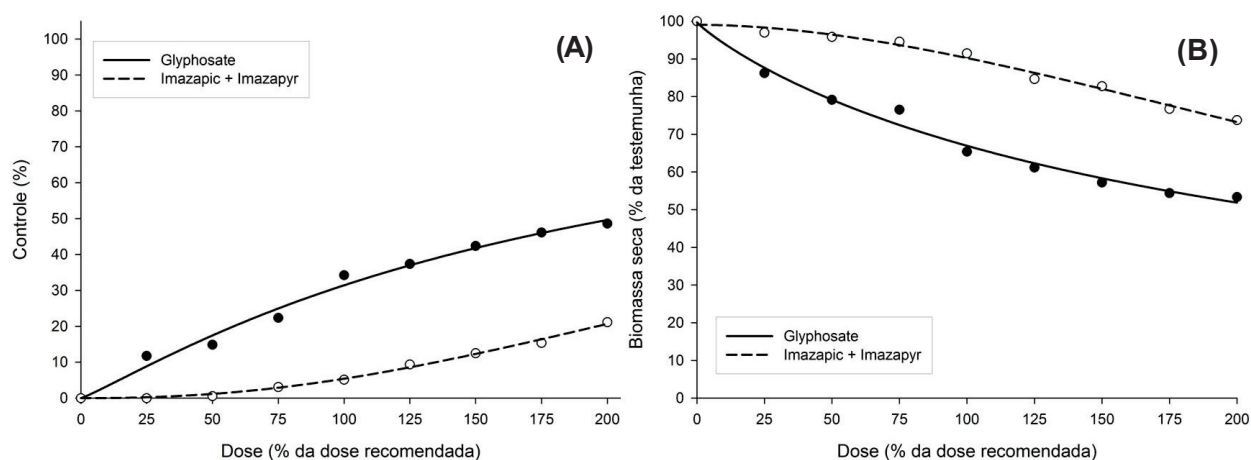


Figura 2 - Percentual de controle (A) e redução da biomassa (B) de plantas perenizadas de *Hymenachne amplexicaulis* por diferentes doses dos herbicidas imazapic (175 g e.a. kg⁻¹) + imazapyr (525 g e.a. kg⁻¹) e glyphosate (480 g e.a. L⁻¹), aos 35 DAA. Santa Maria-RS, 2011.



Tabela 4 - Parâmetros estimados para as equações de resposta de plantas cultivadas de *Hymenachne amplexicaulis* às doses dos herbicidas imazapic (175 g e.a. kg⁻¹) + imazapyr (525 g e.a. kg⁻¹) e glyphosate (480 g e.a. L⁻¹). Santa Maria-RS, 2011

Herbicida	a	b	x ₀	R ²	P	Equação
Parâmetros estimados para controle						
Imazapic + Imazapyr	77,2029	-2,2808	310,9012 ^{2/}	0,9934	<0,0001	Log ^{3/}
	(31,8314) ^{1/}	(0,1830)	(86,0718)			
Glyphosate	97,0857	-1,1268	192,2585	0,9854	0,0001	Log
	(21,5083)	(0,1312)	(72,9568)			
Parâmetros estimados para biomassa seca						
Imazapic + Imazapyr	99,0204	1,8487	351,5283 ^{4/}	0,9815	<0,0001	Log
	(0,9423)	(0,2105)	(26,3432)			
Glyphosate	99,7084	0,9148	218,3986	0,9832	<0,0001	Log
	(2,0325)	(0,0858)	(15,0396)			

^{1/} Valores entre parênteses correspondem ao erro-padrão do parâmetro. ^{2/} Dose do herbicida (% da dose-referência) que causa 50% de

controle (C50) em plantas de *H. amplexicaulis*. ^{3/} Equação logística de três parâmetros $y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$. ^{4/} Dose do herbicida (% da dose-

referência) que causa 50% de redução de massa da biomassa seca (BS₅₀) da parte aérea de plantas de *H. amplexicaulis*.

juvenis, aplicações sequenciais de herbicidas e inibição da produção de sementes – pode auxiliar na redução da infestação por essa planta daninha.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor.

LITERATURA CITADA

AMILIBIA, E.P., et al. **Controle químico da grama-boiadeira na cultura do arroz irrigado**. 2007. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br/arquivos/20070919130022.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2010.

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.

ANTEN, N. P. R. et al. Nitrogen distribution and leaf area indices in relation to photosynthetic nitrogen use efficiency in savanna grasses. **Plant Ecology**, v. 138, n. 1, p. 63-75, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília: 2010. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 18 fev. 2012.

CAPITÂNIO, J. et al. Eficiência agrônômica de herbicidas aplicados em pós-emergência, no controle de capim-capivara (*Hymenachne amplexicaulis*) sobre taipas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 3.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 25., 2003. Balneário Camboriú, SC. **Anais...** Itajaí: Epagri, 2003. p. 706-708.

CARBONARI, C. A. et al. Controle de *Brachiaria subquadripura* e *Brachiaria mutica* através de diferentes herbicidas aplicados em pós-emergência. **Planta Daninha**, v. 21, p. 79-84, 2003. Número Especial

CHARLESTON, K. **Hymenachne (*Hymenachne amplexicaulis*) management. Control methods and case studies**. 2006. Disponível em: <<http://resourceeconomics.cqu.edu.au/FCWViewer/getFile.do?id=7443>>. Acesso em: 18 mar. 2010.

CSURHES S. M. et al. **Hymenachne (*Hymenachne amplexicaulis*) in Queensland**. Pest Status Review Series. Land Protection Dept. of Nat. Resour. Queensland, Australia, 43 p. 1999. Disponível em: <www.nrm.qld.gov.au/pests/psas/pdfs/Hymenachne.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2010.

DIAS-FILHO, M. B. Opções forrageiras para áreas sujeitas a inundação ou alagamento temporário. In: PEDREIRA, C. G. S. et al. (Ed.). **SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM**, 22., 2005, Piracicaba. **Teoria e prática da produção animal em pastagens**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 71-93.

DIAZ, R. et al. **Exotics in the Wetlands: West Indian marsh grass**. 2003. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN49100.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2010.



- FRANS, R.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: SOUTHERN WEED SCIENCE SOCIETY. **Research Methods in Weed Science**. 3.ed. Champaign: 1986. p. 29-45.
- HETHERINGTON, P. et al. The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. **J. Exper. Bot.**, v. 50, n. 339, p. 1567-1576, 1998.
- ISMAIL, B. S.; AHMAD, A. R. Attenuation of the herbicidal activities of glufosinate-ammonium and imazapyr in two soils. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v. 47, n. 4, p. 279-285, 1994.
- JIMÉNEZ E. G.; ESCOBAR, A. Flood adaptations and productivity of Savanna grasses. In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 13., 1977, Leipzig, German Democratic Republic. **Anais...** Leipzig: 1977. p. 3-5.
- JORDAN, D. L. et al. Comparison of graminicides applied at equivalent costs in soybean (*Glycine max*). **Weed Technol.**, v. 11, n. 4, p. 804-809, 1997.
- KIBBLER, H.; BAHNISCH, L. M. Physiological adaptations of *Hymenachne amplexicaulis* to flooding. **Austr. J. Agric. Res.**, v. 39, n. 5, p. 429-435, 1999.
- KINNEAR, S. et al. **Ecological, economic and social considerations of spray control for Hymenachne**. Technical Summary, 11 p. 2008. Disponível em: <<http://lwa.gov.au/node/2589>>. Acesso em: 12 fev. 2010.
- MARTINS, D. et al. Ocorrência de plantas aquáticas nos reservatórios da Light - RJ. **Planta Daninha**, v. 21, p. 105-108, 2003. Número Especial.
- MEDINA, E.; MOTTA, N. Metabolism and distribution of grasses in tropical flooded savannas in Venezuela. **J. Trop. Ecol.**, v. 6, n. 1, p. 77-89, 1990.
- MENEZES, V. G.; RAMIREZ, H. B. Controle de capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*) e capim-capivara (*Hymenachne amplexicaulis*) com o herbicida Clincher em arroz no sistema de cultivo pré-germinado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ARROZ IRRIGADO, 3., REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 25., 2003, Balneário Camboriú, SC. **Anais...** Itajaí: EPAGRI, 2003. p. 507-509.
- SATICHIVI, N. et al. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Sci.**, v. 48, n. 6, p. 675-679, 2000.
- SEEFELDT, S. S. et al. Loglogistic analysis of herbicide dose-response relationship. **Weed Technol.**, v. 9, n. 2, p. 218-227, 1995.
- REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 28., 2010: Bento Gonçalves, RS. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil/Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado**. Porto Alegre: SOSBAI, 2010. 188 p.
- STURZA, V. S. et al. Qualidade forrageira do capim-capivara em áreas de várzea, na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ci. Rural**, v. 41, n. 5, p. 883-887, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. São Paulo: Artmed, 2002. 719 p.
- WENDLER, C. A. et al. Effect of glufosinate (phosphinothricin) and inhibitors of photorespiration on photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity. **J. Plant Physiol.**, v. 139, n. 2, p. 666-671, 1992.



CONSIDERAÇÕES SOBRE AGROTÓXICOS RELACIONADOS À LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO

Enio Marchesan¹, Sergio Luiz de Oliveira Machado², Gustavo Mack Teló³

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da água não afeta apenas a população humana através da água potável, mas também a qualidade dos alimentos produzidos. Nesse sentido, o monitoramento dos recursos hídricos que fornecem água para irrigação de produtos vegetais ou para alimentação de animais é uma estratégia importante no controle da produção de alimentos seguros. A análise da parte comestível das plantas deve fazer parte de um programa de saúde pública, servindo também para orientação de procedimentos no processo de produção agropecuária e de preservação do ambiente.

Os agrotóxicos são um dos componentes que podem comprometer a qualidade do ambiente e dos alimentos, devido à necessidade de uso na agricultura. Dentro deste contexto, se insere a lavoura de arroz irrigado que faz uso de volumes consideráveis de água que, associado à sua localização geográfica próximo a fontes de água e redes naturais de drenagem, merece cuidados especiais no manejo da água de irrigação. Os agrotóxicos podem ser utilizados desde o início da cultura até a fase de maturação, atingindo a planta, a água presente na lavoura e, mesmo com uso tecnicamente correto, podem atingir também organismos-não alvo, mas que estão presentes na lavoura. Além disso, se a água de irrigação das lavouras atingir mananciais hídricos através da rede natural de drenagem pode afetar comunidades de organismos presentes noutros ambientes.

No solo, o efeito dos produtos aplicados deve ser mais bem entendido, não apenas nos cultivos subsequentes, pois pode afetar planos de rotação e sucessão de cultivos, mas também nas suas relações com a comunidade biológica do mesmo. Nas águas, estudos se justificam porque a água é recurso natural utilizado para alimentação humana e para produção agrícola e por ter organismos vivos suscetíveis à ação dos produtos e, portanto, podem servir como indicador de qualidade. Na planta, porque pode ser utilizada para alimentação animal e, especialmente nos grãos porque se destinam à alimentação humana. Com estes conhecimentos pode-se estabelecer parâmetros e limites de aceitação de resíduos de diferentes agrotóxicos, garantido segurança alimentar, preservação do ambiente e produção de alimentos com qualidade.

Nesse sentido, serão apresentados resultados de pesquisa presentes na literatura, quantificando a presença e a persistência de alguns agrotóxicos em águas de irrigação, em rios, no solo, na planta e em grãos de arroz. Por fim, algumas medidas que podem ser utilizadas para minimizar alterações não desejadas, provocadas pelo uso de agrotóxicos relacionados à lavoura de arroz irrigado.

¹Eng. Agr. Prof. Titular, Dr., Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. E-mail: emarchezan@terra.com.br

²Eng. Agr. Prof. Titular, Dr. Departamento de Defesa Fitossanitária da UFSM. E-mail: slomachado@yahoo.com.br

³Eng. Agr. Doutorando do Programa de Pós-graduação em Agronomia da UFSM, bolsista CNPq. E-mail: gustavo.telo@yahoo.com.br

Os resultados aqui apresentados foram, em boa parte, produzidos por grupos de pesquisadores da Universidade Federal de Santa Maria, proposto para esta apresentação, que se envolveram na busca do avanço no conhecimento desta questão com o objetivo de contribuir para o uso mais seguro dos agrotóxicos na lavoura de arroz irrigado.

À todos, muito obrigado pela contribuição.

2. ALGUNS DADOS DE LITERATURA

Quando da aplicação de determinado produto nas lavouras, a água é candidata ao destino de parte destes compostos, pois os recursos hídricos agem como integradores dos processos biológicos. Na sua maioria, as lavouras de arroz irrigado estão localizadas em baixadas às margens de córregos e outros mananciais hídricos com grande possibilidade de serem contaminados pelos agrotóxicos aplicados na cultura. O cultivo de arroz irrigado demanda uso de agrotóxicos, que associados ao método de aplicação e à prática de manejo da água de irrigação, podem representar riscos ao ambiente, especialmente para a qualidade da água e para os organismos aquáticos.

A Tabela 1 contém resultados de pesquisa a respeito da persistência de alguns agrotóxicos relacionados à lavoura de arroz irrigado e detectados na água. São apresentados os agrotóxicos avaliados, a fonte de água amostrada, o método utilizado, as concentrações dos produtos na água e a persistência. Os dados refletem a diversidade de situações em que as pesquisas foram realizadas. Quanto à presença dos agrotóxicos na água verificam-se situações onde não foi detectado a até concentrações que merecem reflexão. A persistência na água também apresentou ampla variação, de não detectado a até 99 dias. Estes dados evidenciam que a água de irrigação deve permanecer na lavoura o maior período possível após a aplicação dos agrotóxicos, como medida inicial de segurança.

Tabela 1- Persistência de agrotóxicos e de metabólitos na água de irrigação em lavouras de arroz irrigado.

Agrotóxicos	Local de coleta	Método	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Persistência (dias)	Fonte
Bentazon	AL ⁵	CG-EM ¹²	0,03	---	STUMPF <i>et al.</i> (1997)
Bentazon	ALA ³	CLAE-UV ⁹	1,1 (1 ano) a 1,8 (2 anos)	21	MACHADO <i>et al.</i> (2003)
Bentazon	AR	GC-ECD	2,3 a 0,6	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2010)
Clomazone	ALA	CG	0,6	32	NOLDIN <i>et al.</i> (1997)
Clomazone	ALA	CG	3,80 a 1,29	24	HERMES <i>et al.</i> (1999)
Clomazone	ALA	CLAE-UV	1,3 (1 ano) a 2,0 (2 anos)	28	MACHADO <i>et al.</i> (2001)
Clomazone	ALA	CLAE-UV	2,2	28	ZANELLA <i>et al.</i> (2002)
Clomazone	AR ⁴	CLAE-UV	7,72 a 0,65	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2002)
Clomazone	ALA	CLAE/DAD	87,48 a 15,0	13	SANTOS <i>et al.</i> (2008)
Clomazone	AR	HPLC-DAD	6,51 a nd ¹³	---	GRÜTZMACHER <i>et al.</i> (2008)
Clomazone	AR	HPLC-DAC	12,1 a nd	---	MACEDO <i>et al.</i> (2009)
Clomazone	AA ⁶ , AR, AL, CI ⁷	CLAE-EM/EM ¹¹	0,064 a 0,008	---	SILVA <i>et al.</i> (2009)
Clomazone	AR	GC-ECD	2,2 a nd	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2010)
Clomazone	ALA	HPLC-UV	42,0 a 0,07	28	REIMCHE (2010)
Glyphosate	ALA	CLAE-UV	144 a nd	---	MATTOS <i>et al.</i> (2002)
Glyphosate	CD	CLAE-UV	nd	---	MATTOS <i>et al.</i> (2002)
AMPA ²	ALA	CLAE-UV	113,6 a nd	---	MATTOS <i>et al.</i> (2002)
AMPA	CD	CLAE-UV	6,9 a 5,3	---	MATTOS <i>et al.</i> (2002)
Imazethapyr	ALA	CLAE-UV	2,69 a 1,16	30	MARCOLIN <i>et al.</i> (2003)
Imazethapyr	ALA	CLAE/DAD	18,9 a 0,6	27	SANTOS <i>et al.</i> (2008)
Imazethapyr	ALA	CLAE-MS/MS	0,074	---	MATTOS <i>et al.</i> (2009)
Imazethapyr	AA ⁶ , AR, AL, CI ⁷	CLAE-EM/EM ¹¹	0,326 a nd	---	SILVA <i>et al.</i> (2009)
Imazethapyr	AR	GC-ECD	0,4 a nd	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2010)
Imazethapyr	ALA	HPLC-UV	16,0 a 3,2	35	REIMCHE (2010)
Imazethapyr	ALA	HPLC-UV	12,5 a 1,4	21	REIMCHE (2010)
Imazapic	ALA	CLAE-MS/MS	0,063 a 0,051	99	MATTOS <i>et al.</i> (2009)
Imazapic	ALA	HPLC-UV	10,0 a 1,8	21	REIMCHE (2010)
Metsulfuron-methyl	ALA	CLAE-UV	1,25	7	MACHADO <i>et al.</i> (2001)
Molinate	AR	CLAE-UV e CG-EM	1160 a 90	---	LAVY <i>et al.</i> (1998)
Molinate	AR e CD ⁸	CG-EM	1,0 a 0,025	---	CREPEAU & KUIVILA(1998)
Molinate	AL	CG-EM	1,11 a 0,55	---	SUDO <i>et al.</i> (2002)
Oxadiazon	AL	CG-EM	0,99 a 0,07	---	SUDO <i>et al.</i> (2002)
Pendimethalin	AR	CG-EM	0,0167 a nd	---	BARRA <i>et al.</i> (1999)
Penoxsulam	AA ⁶ , AR, AL, CI ⁷	CLAE-EM/EM ¹¹	15 a nd	---	SILVA <i>et al.</i> (2009)
Penoxsulam	ALA	HPLC-UV	28,0 a 2,5	28	REIMCHE (2010)
Penoxsulam	ALA	HPLC-UV	39,0 a 9,0	91	REIMCHE (2010)
Propanil	AR	CLAE-UV	7,34 a 0,80	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2002)
Propanil	ALA	CLAE-UV	0,95	7	MACHADO <i>et al.</i> (2003)
Propanil	AR	GC-ECD	3,0 a nd	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2010)
3,4-DCA ¹	AR	CG	2,10 a 0,29	---	WEGMAN & DE KORTE (1981)

Quinclorac	AR	CLAE-UV e CG-EM	818 a 43	---	LAVY <i>et al.</i> (1998)
Quinclorac	AR	CLAE-UV	6,60 a 0,41	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2002)
Quinclorac	ALA	CLAE-UV	3,0 a 2,8	21	MACHADO <i>et al.</i> (2003)
Quinclorac	ALA	CG	24,6 a 1,13	---	RESGALLA Jr. <i>et al.</i> (2007)
Quinclorac	AR	HPLC-DAD	5,34 a 0,40	---	GRÜTZMACHER <i>et al.</i> (2008)
Quinclorac	AA ⁶ , AR, AL, CI ⁷	CLAE-EM/EM ¹¹	0,12 a nd	---	SILVA <i>et al.</i> (2009)
Quinclorac	AR	GC-ECD	2,0 a nd	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2010)
2,4-D	AL	CG-EM	0,05	---	STUMPF <i>et al.</i> (1997)
2,4-D	AR	CLAE-UV e CG-EM	360 a 91	---	LAVY <i>et al.</i> (1998)
2,4-D	ALA	CLAE-UV	20	10	MACHADO <i>et al.</i> (2003)
2,4-D	AR	GC-ECD	2,2 a 0,4	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2010)
Bispyribac-sodium	ALA	HPLC-UV	17,0 a 0,8	70	REIMCHE (2010)
Thiobencarb	AL	CG-EM	0,06 a 0,03	---	SUDO <i>et al.</i> (2002)
Betaciflutrina	AR	GC-ECD	nd	---	GRÜTZMACHER <i>et al.</i> (2008)
Carbufuran	AR	HPLC-DAD	14,99 a 0,50	---	GRÜTZMACHER <i>et al.</i> (2008)
Carbufuran	AR	GC-ECD	0,6 a nd	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2010)
Cipermetrina	ALA	GC-ECD	nd	---	TELÓ <i>et al.</i> (2009)
Lambda-Cialotrina	ALA	GC-ECD	nd	---	TELÓ <i>et al.</i> (2009)
Fipronil	AR	GC-ECD	1,14 a nd	---	GRÜTZMACHER <i>et al.</i> (2008)
Fipronil	AR	GC-MS	4,1 a nd	---	MACEDO <i>et al.</i> (2009)
Fipronil	AR	GC-ECD	7,0 a 0,5	---	MARCHESAN <i>et al.</i> (2010)
Azoxistrobina	ALA	GC-ECD	8,6 a 0,8	40	TELÓ <i>et al.</i> (2009)
Difeconazole	ALA	GC-ECD	nd	---	TELÓ <i>et al.</i> (2009)
Trifloxistrobina	ALA	GC-ECD	nd	---	TELÓ <i>et al.</i> (2009)

¹Ácido dicloropropiônico (metabólito do propanil); ²Ácido aminometilfosfônico (metabólito do glifosato); ³Água da lavouras; ⁴Água de rios; ⁵Água de lagoas; ⁶Água de Arroio; ⁷Canal de irrigação; ⁸Canal de drenagem; ⁹Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com absorção no Ultravioleta; ¹⁰ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector por Arranjos de Diodos; ¹¹Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massa; ¹²Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa; ¹³Não detectado.

Adaptado de Machado et al., 2003

3. PERSISTÊNCIA DE ALGUNS AGROTÓXICOS NA LAVOURA

3.1 Na água da lavoura

As Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentam os resultados de pesquisas destinadas a quantificar a dissipação de alguns agrotóxicos na água de irrigação da lavoura de arroz irrigado.

Os resultados mostraram que a concentração dos agrotóxicos na água decresceu com o tempo variando entre os produtos estudados. Na média das duas safras, a persistência decresceu na seguinte ordem: quinclorac > bispiribac-sódio = penoxsulam > carbofuran > imazapic > imazethapir = fipronil > clomazone com persistência de 84, 60, 60, 42, 39, 28, 28 e 25 dias, respectivamente. Dentre os agrotóxicos, quinclorac mostrou maior tempo de dissipação (DT_{50}) com 15,4 dias, enquanto clomazone apresentou o menor valor de meia-vida na água com 1,9 dias. Eventos como a precipitação pluvial e a suplementação de água para manter a altura da lâmina constante na lavoura são fatores adicionais que podem modificar a concentração dos agrotóxicos. Deste modo, quanto menor o intervalo de tempo entre a aplicação e as chuvas, maior será a vulnerabilidade dos mananciais hídricos à jusante das lavouras de arroz. Assim, há necessidade do monitoramento de agrotóxicos em corpos d'água principalmente quando estes produtos são aplicados em períodos com chuvas freqüentes e intensas (REIMCHE, 2010).

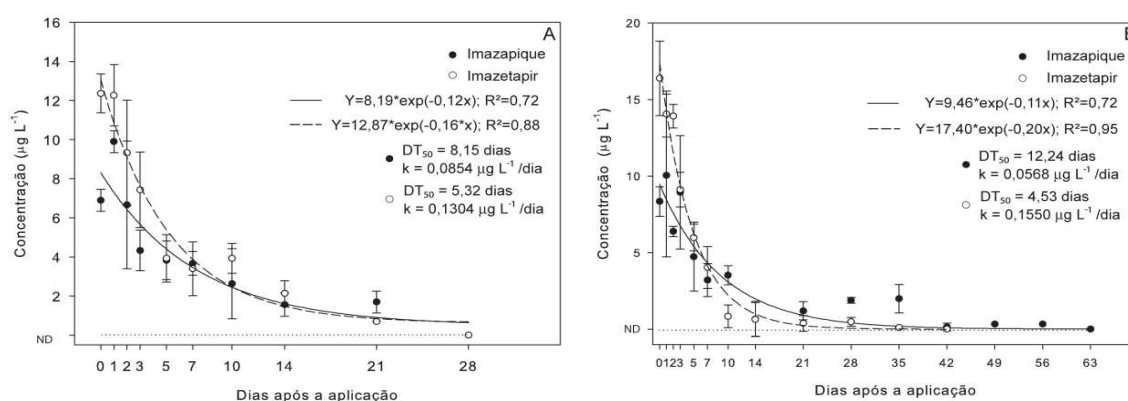


Figura 1- Curvas de dissipação de imazethapir e imazapic na água de irrigação em parcelas com arroz cultivado no sistema de plantio direto nas safras de 2007/08 (A) e 2008/09 (B). Fonte:Reimche, 2010

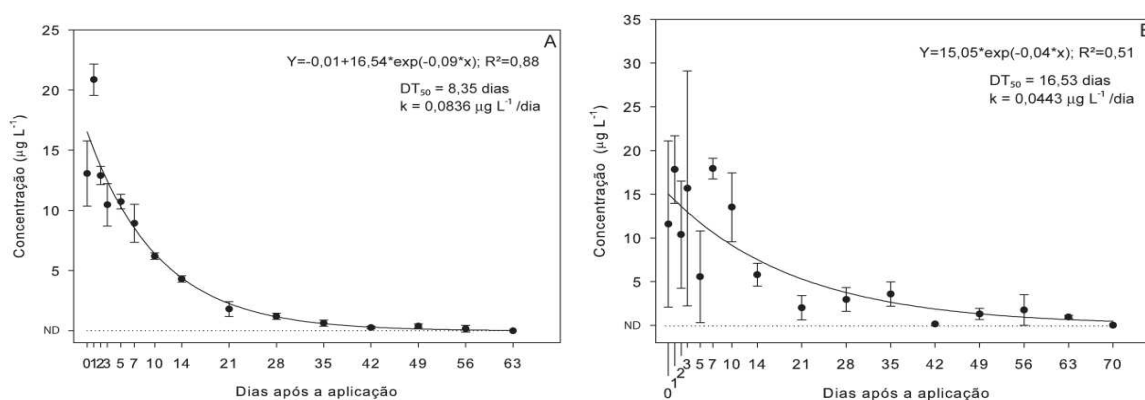


Figura 2- Curvas de dissipação de bispiribac-sódio na água de irrigação em parcelas com arroz cultivado no sistema de plantio direto nas safras de 2007/08 (A) e 2008/09 (B). Fonte: Reimche, 2010

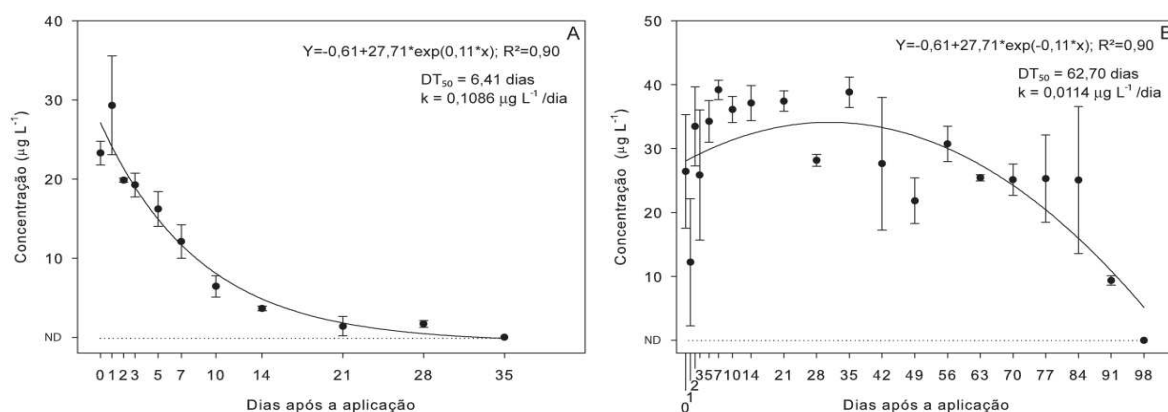


Figura 3- Curvas de dissipação de penoxsulam na água de irrigação em parcelas com arroz cultivado no sistema de plantio direto nas safras de 2007/08 (A) e 2008/09 (B).
Fonte: Reimche, 2010

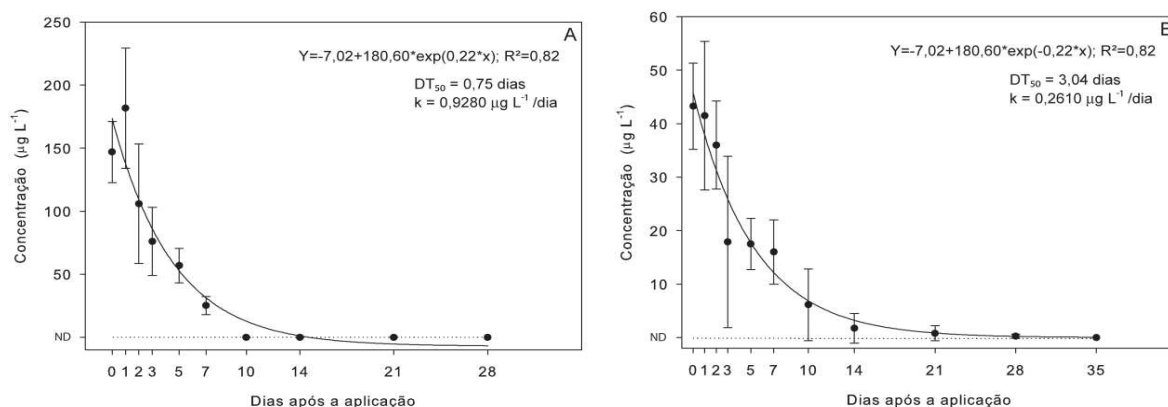


Figura 4- Curvas de dissipação de clomazone na água de irrigação de parcelas com arroz cultivado no sistema plantio direto nas safras de 2007/08 (A) e 2008/09 (B).
Fonte: Reimche, 2010

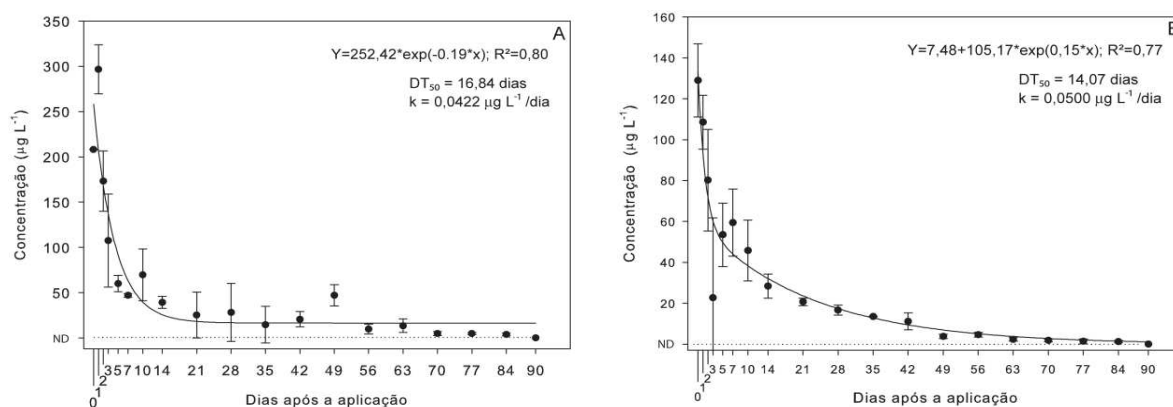


Figura 5 - Curvas de dissipação de quinclorac na água de irrigação das parcelas com arroz cultivado no sistema de plantio direto nas safras de 2007/08 (A) e 2008/09 (B).
Fonte: Reimche, 2010

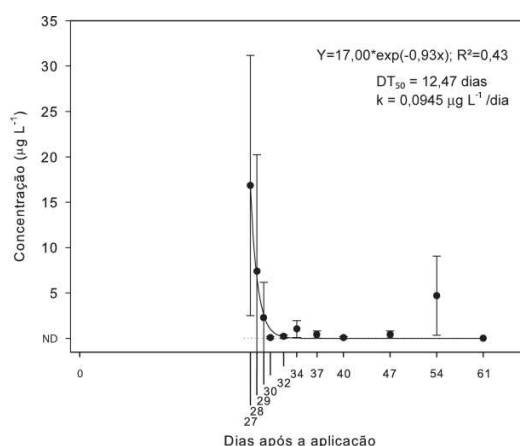


Figura 7 - Curvas de dissipação de fipronil na água de irrigação das parcelas com arroz cultivado no sistema cultivo de plantio direto nas safras de 2007/08.

Fonte: Reimche, 2010

Para avaliar a concentração e a massa de agrotóxicos transportados para o ambiente em função de diferentes sistemas de irrigação na lavoura de arroz irrigado (Figura 8, Tabela 2), estudou-se o sistema de irrigação por inundação contínua, intermitente e por banhos, (MARTINI, 2010). Foram observadas concentrações detectáveis até o fim do monitoramento, aos 93 dias após o início da irrigação, para imazapic, imazethapyr, clomazone e imidacloprid exceto para o inseticida thiamethoxan, que foi detectado até aos 41 dias após o início da irrigação. No entanto, as maiores concentrações de agrotóxicos em água ocorrem próximo à sua aplicação, sendo de fundamental importância o cuidado na manutenção da água de irrigação no interior da lavoura nesse período. Os resultados observados mostram que os sistemas de irrigação intermitente e por banhos, proporcionam redução das perdas de água por extravasamento e por consequência, redução da massa de agrotóxicos transportados para o ambiente em relação ao sistema de irrigação contínuo. A massa de agrotóxicos transportada não ultrapassa 3% do total aplicado.

TELÓ *et al.*, 2009, avaliando a concentração de fungicidas e inseticidas na água de irrigação (Figura 9), aplicados a partir do estágio R₂ da cultura do arroz (emborrachamento), detectaram concentrações de azoxystrobin durante os 40 dias de monitoramento, sendo as maiores concentrações no 3º dia após a aplicação, e evidenciados concentrações elevadas após a realização da segunda aplicação (15 dias após a primeira aplicação). Os demais agrotóxicos (difenoconazole, trifloxistrobina, cipermetrina e lambda-cialotrina) não foram detectadas na água de irrigação.

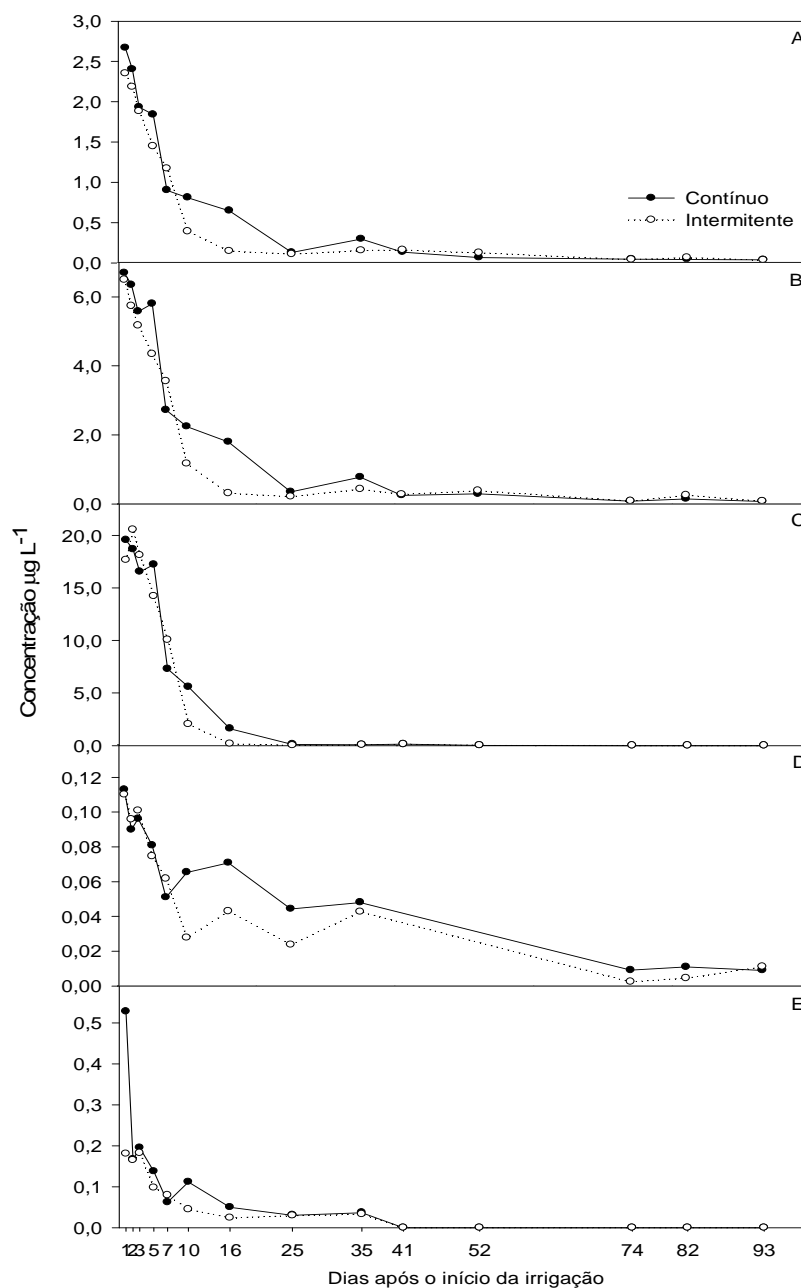


Figura 8- Curva de dissipação dos herbicidas imazapic (A), imazethapyr (B), clomazone (C) e dos inseticidas imidacloprid (D) e tiamethoxam (E), em $\mu\text{g L}^{-1}$, em relação aos manejos de irrigação por inundação contínua e intermitente. Santa Maria, RS. 2009.

Fonte: Martini, 2010

Tabela 2- Massa total de imazethapyr, imazapic, clomazone, imidacloprid, thiamethoxam, trifloxystrobin e propiconazol transportados e porcentagem destes em relação ao total aplicado nos sistemas de irrigação contínuo, intermitente e por banhos. Santa Maria, RS. 2009.

Tratamento	Imazet.	Imazapic	Clomaz.	Imidaclop.	Thiamet.	Trifloxyst.	Propic.	Permethrin	Média
----- Massa total dos ingredientes ativos transportados (g ha ⁻¹) ¹ -----									
Contínuo	0,636	0,672	0,547	0,180	0,385	2,593	2,648	nd ²	1,094 a ³
Intermitente	0,189	0,252	0,334	0,051	0,071	1,474	1,819	nd	0,598 b
Banho	0,179	0,311	0,447	0,099	0,041	1,097	0,905	nd	0,440 b
Média	BC 0,335	B 0,412	B 0,443	C 0,101	C 0,165	A 1,721	A 1,791	nd	
----- Porcentagem transportada em relação ao total aplicado na lavoura ¹ -----									
Contínuo	2,544	0,897	0,521	0,018	0,802	2,765	2,825	nd	1,482 a
Intermitente	0,754	0,336	0,318	0,005	0,148	1,572	1,940	nd	0,725 b
Banho	0,717	0,415	0,426	0,010	0,085	1,170	0,965	nd	0,541 b
Média	A 1,338	B 0,549	BC 0,421	C 0,011	BC 0,345	A 1,836	A 1,910	nd	

¹ Para a análise, os dados foram transformados para $y_t = \sqrt{y}$; ² nd = Não detectado; ³ Média não ligada por mesma letra na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

Fonte: Martini, 2010

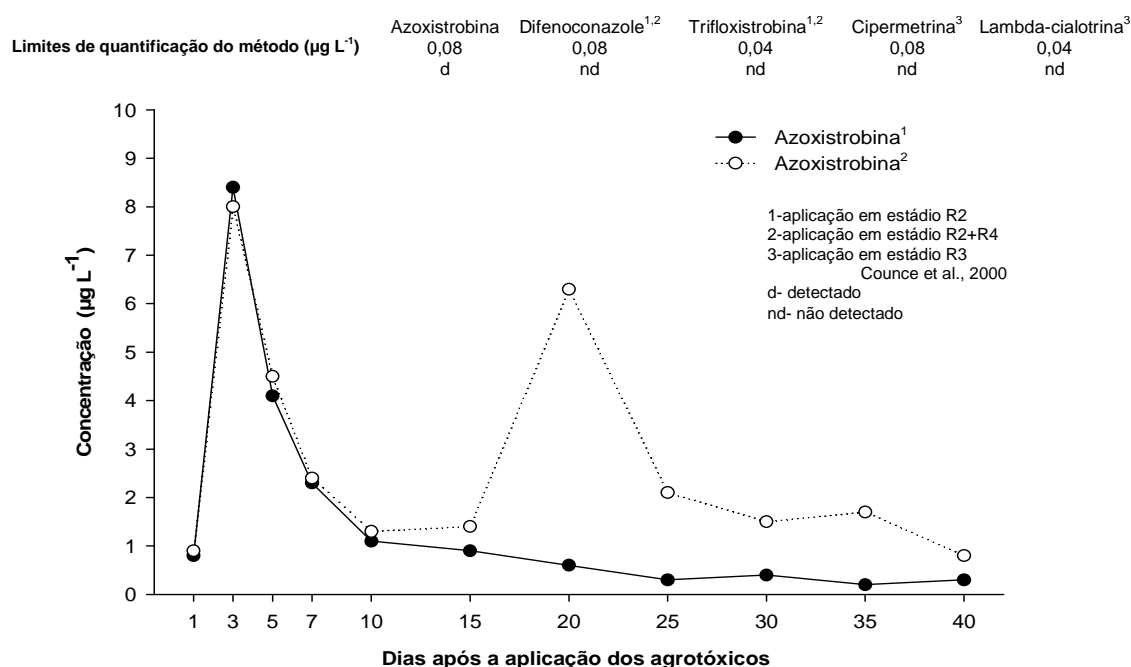


Figura 9- Concentração de agrotóxicos detectados na água de irrigação da lavoura de arroz irrigado na safra de 2007/08. Santa Maria-RS, 2009.

Fonte: Teló et al., 2009

3.2 Na água de rios

Com o objetivo de determinar resíduos de agrotóxicos na água de rios, foi realizado um estudo para quantificar os herbicidas clomazone, quinclorac, propanil, bentazona, 2,4-D e imazethapyr e dos inseticidas carbofuran e fipronil nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim (Tabela 3 e 4), situados na Depressão Central do Rio Grande do Sul. As coletas das amostras de água foram feitas de novembro a fevereiro, durante o cultivo do arroz. O monitoramento das águas dos rios por um período de oito safras de arroz revelou que há presença de agrotóxicos (herbicidas e inseticidas) utilizados na lavoura de arroz, nas águas dos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim, durante o período de

cultivo de arroz irrigado. No período analisado, os herbicidas clomazone e quinclorac e o inseticida fipronil foram os agrotóxicos encontrados com mais frequência nas amostras de água dos rios. (MARCHESAN *et al.*, 2010a).

Tabela 3- Concentração de herbicidas e inseticidas na água do rio Vacacaí. Santa Maria, RS. 2010.

Safras	Agrotóxicos	Total de amostras ⁽¹⁾	% AC ⁽²⁾	-----Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$ -----		
				Mínimo	Média	Máximo
2001/02	Clomazone	36	30	1,32	4,09	7,72
	Propanil		17	1,08	1,76	3,94
	Quinclorac		0	-	-	-
2002/03	Clomazone	30	20	1,50	4,97	8,85
	Propanil		20	0,72	5,59	11,0
	Quinclorac		0	-	-	-
2003/04	Clomazone	42	26,2	0,8	2,2	4,7
	Quinclorac		0	nd	nd	nd
	Propanil		21,4	0,7	2,3	5,4
	Bentazon		14,3	0,7	2,3	3,6
	2,4-D		26,2	0,9	1,8	2,7
	Ao menos 1 ⁽³⁾		66,7	-	-	-
2004/05	Clomazone	36	38,8	0,2	0,6	1,5
	Quinclorac		41,7	0,6	0,9	2,5
	Propanil		0	nd	nd	nd
	Bentazon		2,7	0,6	0,6	0,6
	2,4-D		2,7	0,4	0,4	0,4
	Ao menos 1 ⁽³⁾		63,9	-	-	-
2005/06	Imazethapyr	33	15	0,1	0,1	0,2
	Quinclorac		0	nd	nd	nd
	Clomazone		3	0,3	0,3	0,3
	Carbofuran		21	0,1	0,3	0,4
	Fipronil		90	0,05	3,5	16,3
	Ao menos 1 ⁽³⁾		94	-	-	-
2006/07	Imazethapyr	30	0	nd	nd	nd
	Quinclorac		0	nd	nd	nd
	Clomazone		0	nd	nd	nd
	Carbofuran		0	nd	nd	nd
	Fipronil		80	2,2	6	26,2
	Ao menos 1 ⁽³⁾		80	-	-	-
2007/08	Imazethapyr	18	5,5	0,4	0,4	0,4
	Quinclorac		0	nd	nd	nd
	Clomazone		5,5	0,3	0,3	0,3
	Carbofuran		5,5	0,6	0,6	0,6
	Fipronil		5,5	0,5	0,5	0,5
	Ao menos 1 ⁽³⁾		16,7	-	-	-

* Limite de Quantificação, em $\mu\text{g L}^{-1}$: imazethapyr = 0,1; quinclorac = 0,6; carbofuran = 0,1; clomazone = 0,2; fipronil = 0,01; bentazon = 0,2, propanil = 0,1 e 2,4-D = 0,1. ^(nd) não detectado; ⁽¹⁾ Número total de amostras analisadas; ⁽²⁾ Percentagem de amostras contaminadas; ⁽³⁾ Amostras com a presença de pelo menos um agrotóxico.

Fonte: Marchesan *et al.*, 2007; Marchesan *et al.*, 2010a

Tabela 4 - Concentração de herbicidas e inseticidas na água do rio Vacacaí-Mirim. Santa Maria, RS. 2010.

Safras	Agrotóxicos	Total de amostras ⁽¹⁾	% AC ⁽²⁾	-----Concentração (µg L ⁻¹) ⁽⁴⁾ -----		
				Mínimo	Média	Máximo
2000/01	Clomazone	104	27	0,41	1,34	5,62
	Propanil		2	0,80	0,86	0,92
	Quinclorac		13	0,48	1,57	6,60
2001/02	Clomazone	45	11	1,24	2,38	4,82
	Propanil		7	1,31	4,98	7,34
	Quinclorac		9	1,87	2,79	3,81
2002/03	Clomazone	45	20	0,62	2,17	5,10
	Propanil		24	0,58	5,62	12,9
	Quinclorac		0,	-	-	-
2003/04	Clomazone	65	15,4	0,9	1,9	3,4
	Quinclorac		7,7	1,1	2,0	3,3
	Propanil		15,4	0,9	3,0	5,2
	Bentazon		12,3	0,8	1,7	3,5
	2,4-D		20	0,8	2,2	3,2
	Ao menos 1 ⁽³⁾		58,5	-	-	-
2004/05	Clomazone	55	34,5	0,2	0,6	1,7
	Quinclorac		36,4	0,6	1,4	4,1
	Propanil		0	nd	nd	nd
	Bentazon		7,3	0,6	1,3	1,8
	2,4-D		7,3	0,3	1,2	3,4
	Ao menos 1 ⁽³⁾		60	-	-	-
2005/06	Imazethapyr	70	12,8	0,1	0,4	1,2
	Quinclorac		21,4	0,6	0,8	2,0
	Clomazone		2,8	0,2	0,3	0,4
	Carbofuran		7,1	0,2	0,5	0,8
	Fipronil		87	0,1	3,3	16,4
	Ao menos 1 ⁽³⁾		93	-	-	-
2006/07	Imazethapyr	30	0	nd	nd	nd
	Quinclorac		0	nd	nd	nd
	Clomazone		0	nd	nd	nd
	Carbofuran		0	nd	nd	nd
	Fipronil		66,6	2,1	7	19,4
	Ao menos 1 ⁽³⁾		66,6	-	-	-
2007/08	Imazethapyr	24	8,3	0,4	0,4	0,5
	Quinclorac		0	nd	nd	nd
	Clomazone		8,3	0,3	0,4	0,6
	Carbofuran		4,2	0,6	0,6	0,6
	Fipronil		4,2	0,6	0,6	0,6
	Ao menos 1 ⁽³⁾		25	-	-	-

* Limite de Quantificação, em µg L⁻¹: imazethapyr = 0,1; quinclorac = 0,6; carbofuran = 0,1; clomazone = 0,2; fipronil = 0,01; bentazon = 0,2, propanil = 0,1 e 2,4-D = 0,1. ^(nd) não detectado; ⁽¹⁾ Número total de amostras analisadas; ⁽²⁾ Percentagem de amostras contaminadas; ⁽³⁾ Amostras com a presença de pelo menos um agrotóxico.

Fonte: Marchesan et al., 2007; Marchesan *et al.*, 2010a

SILVA *et al.* (2009a) relataram a quantidade de agrotóxicos encontrados em águas superficiais de diferentes regiões orizícolas do RS e de SC, que receberam contribuição de águas de lavoura de arroz. Foram coletadas amostras de água de sete regiões produtoras de arroz do RS, em três épocas durante a safra 2007/08. Em geral, Tabela 5, os mananciais da região sul do RS apresentam menor número de agrotóxicos nas amostras de águas superficiais destacando-se a presença de imazethapyr, carbofuran e tebuconazole, enquanto que a Depressão Central e Planície Costeira Externa a Laguna dos Patos foram as regiões com maior número de agrotóxicos detectados. Quanto à época, o maior número de amostras contaminadas por agrotóxicos foi observado após drenagem da água das lavouras.

Tabela 5- Frequência (%) de agrotóxicos em águas superficiais em regiões orizícolas do sul do Brasil na safra 2007/08 na média das amostras coletadas em três locais de cada região e três épocas de monitoramento. FAEM/UFPeI, 2009.

Agrotóxicos	Campanha	Fronteira Oeste	Sul	Depressão Central	Cost. Interna Laguna. Patos	Cost. Externa Laguna Patos	Santa Catarina
Clomazone	55,6	33,3	nd	22,2	22,2	33,3	11,1
Quinclorac	11,1	11,1	nd	22,2	nd	nd	33,3
Penoxsulam	nd ¹	nd	nd	nd	nd	22,2	11,1
Imazethapyr	55,6	66,7	12,5	55,6	44,4	77,8	33,3
Imazapic	33,3	33,3	nd	11,1	22,2	33,3	nd
Carbofuran	22,2	11,1	25,0	22,2	33,3	44,4	22,2
3-hidroxi-carbofuran	nd	nd	nd	22,2	nd	11,1	nd
Tebuconazole	22,2	33,3	37,5	22,2	nd	22,2	33,3

¹nd=não detectado

Fonte: Silva *et al.*, 2009a

Para avaliar e monitorar a presença de agrotóxicos nas águas do canal São Gonçalo e do rio Piratini, localizados na região sul do Estado do RS (Tabela 6), foram coletadas amostras de água em cinco datas diferentes, sendo três amostras de água do rio Piratini e quatro do canal São Gonçalo, para cada coleta. Foram encontrados resíduos de carbofuran, quinclorac, clomazone e fipronil nas águas do Canal São Gonçalo e do Rio Piratini. Resíduos de betaciflutrina não são encontrados nas águas do Canal São Gonçalo nem do Rio Piratini. Dos agrotóxicos estudados, carbofuran e quinclorac são os mais persistentes. As águas localizadas em pontos mais baixos (menores altitudes), como as próximas do Laranjal, apresentam maiores quantidades de resíduos de agrotóxicos. Os resíduos de agrotóxicos na água reduziram da semeadura à colheita do arroz. (GRÜTZMACHER *et al.*, 2008).

Tabela 6- Número de amostras de água com resíduos para os diferentes agrotóxicos estudados. Pelotas, RS, Brasil, 2007

Agrotóxicos	Amostras com resíduos						Total	%
	1º*	2º	3º	4º	5º			
Carbofuran	5	4	3	2	2		16	35
Quinclorac	6	2	2	4	1		15	33
Clomazone	0	1	3	2	1		7	16
Fipronil	7	0	0	0	0		7	16
Betaciflutrina	0	0	0	0	0		0	0
Total	18	7	8	8	4		45	100

*1º:30/11/2005; 2º:29/12/2005; 3º: 31/01/2006; 4º:28/02/2006; 5º 28/03/2006

Fonte: Grützmacher *et al.*, 2008

3.3 Em mananciais subterrâneos

Em mananciais subterrâneos, ao menos dois agrotóxicos foram detectados em águas das regiões orizícolas do RS e Santa Catarina (SILVA *et al.*, 2009b). Na Figura 9, de acordo com os autores, todas as amostras de água contaminadas apresentaram concentrações abaixo do limite de potabilidade. Os herbicidas imazethapyr e clomazone foram detectados em maior frequência. Não foi detectado a presença de penoxsulam, carbofuran, 3-hidroxi-carbofuran e tebuconazole em águas subterrâneas.

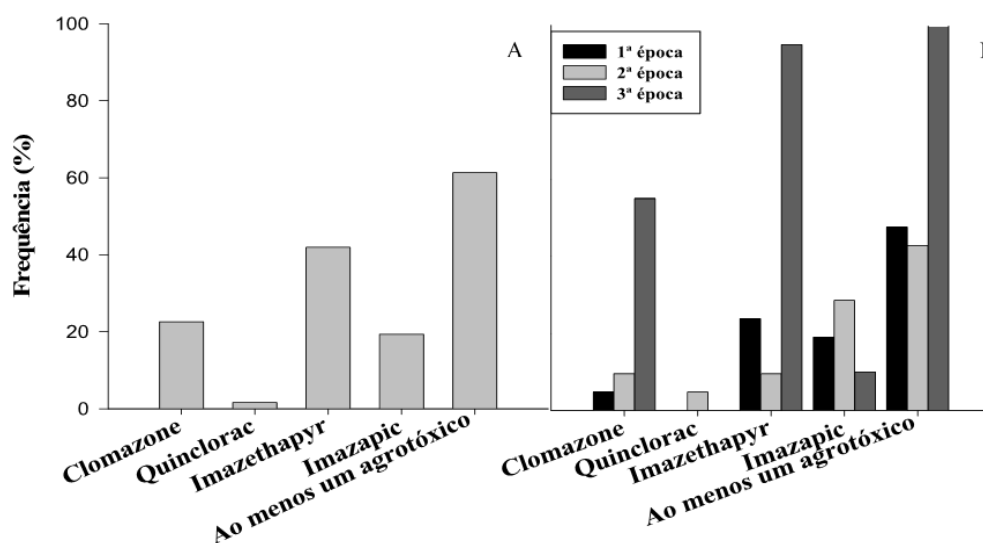


Figura 9- Frequência de amostras com concentrações detectáveis de agrotóxicos em águas subterrâneas no total das três épocas e nas regiões orizícolas (A) e frequência de amostras com concentração detectáveis de agrotóxicos nas diferentes épocas de amostragem em águas subterrâneas (B) em regiões orizícolas do sul do Brasil na safra 2007/08. FAEM/UFPel, 2009. (1ª época: anterior ao cultivo de arroz; 2ª época: durante o cultivo do arroz; 3ª época: após a drenagem da água das lavouras.

Fonte: Silva et al., 2009b

3.4 No solo

Visando determinar o posicionamento do imazethapyr em profundidade, no perfil de um solo de várzea (Figura 10), foram coletadas amostras em diferentes profundidades (0-5, 5-10, 10-15 e 15-20 cm), do solo de várzea sob dois sistemas de manejo: plantio convencional (PC) e plantio direto (PD), em uma área onde havia sido utilizado o sistema CL por dois anos e no terceiro ano, arroz não tolerante.

Os resultados mostram que o imazethapyr lixivia até 20cm em solo de várzea independentemente do sistema de cultivo. Ocorre maior concentração de imazethapyr na superfície do solo (0-5cm), no sistema convencional, quando comparado com o sistema de plantio direto. A quantidade total de herbicida remanescente no solo 540 dias após a última aplicação não é afetada pelo sistema de preparo do solo. Porém, o preparo de solo afeta a distribuição do imazethapyr no perfil. No sistema plantio convencional, o herbicida distribui-se de modo uniforme nos primeiros 15cm de solo e, no sistema de plantio direto, apresenta menor concentração na camada de 0-5cm e acumula-se entre 5-15cm de profundidade. (KRAEMER *et al.*, 2009a).

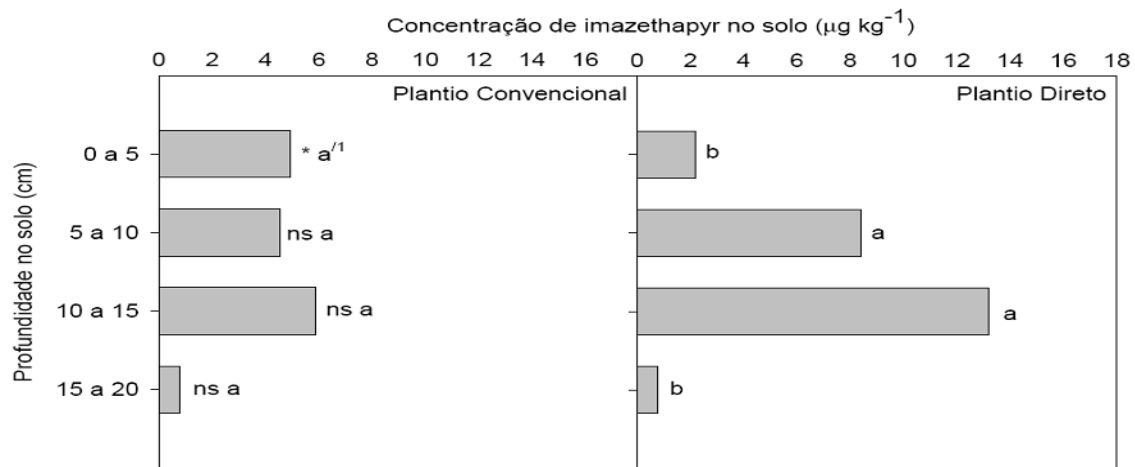


Figura 10- Concentração de imazethapyr, expressa em µg de ingrediente ativo por kg de solo (µg kg⁻¹), em dois manejos de solo, plantio convencional (PC) e plantio direto (PD) e quatro profundidades (0-5, 5-10; 10-15 e 15-20cm), após a colheita de arroz no terceiro ano de um sistema de rotação com dois anos de arroz Clearfield® e um ano de arroz não tolerante (540 dias após a última aplicação do herbicida). Santa Maria, RS, 2009. ¹Médias não ligadas por mesma letra minúsculas, comparando profundidades, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro; ^{ns}Não há diferença significativa entre os sistemas de preparo do solo; *Diferença significativa entre os sistemas de preparo do solo.

Fonte: Kraemer et al., 2009a

Nas mesmas condições de solo onde foi realizado trabalho frente a dois tipos de manejo do solo (Tabela 7), concluiu-se que o efeito residual da mistura formulada de imazethapyr e imazapic reduziu o estande de plantas, o perfilhamento, o número de panículas e a altura de plantas do cultivar não tolerante IRGA 417, sem alterar a produtividade de grãos. O revolvimento do solo diminuiu a atividade do herbicida na sua camada superficial (0-3 cm). Os diferentes sistemas de manejos de solo avaliados não alteraram o comportamento agrônomo: estande de plantas, número de colmos, altura de plantas, número de panículas, esterilidade de espiguetas, número de grãos por panícula, massa de grãos e produtividade (KRAEMER *et al.*, 2009b).

Tabela 7 - Número de colmos por m² (colmos m⁻²), número de panículas por m² (panículas m⁻²), esterilidade de espiguetas (% esterilidade), número de grãos por panículas (grãos/panícula), peso de 1000 grãos em g (peso 1000 grãos) e produtividade de grãos(kg ha⁻¹), para nove preparos do solo (PS) e duas cultivares, em resposta ao efeito residual de dois anos dos herbicidas imazethapyr e imazapic (75+25 g a.i. ha⁻¹) (Only®). Santa Maria, RS. 2006/07.

Variáveis	Colmos (m ⁻²)	Panículas (m ⁻²)	Esterilidade (%)	Grãos/panícula (nº)	Massa 1000 grãos (g)	Produtividade (kg ha ⁻¹)
Preparo do solo (PS)	519	383	6,8	89	26,9	9.849
Significância ²	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IRGA 422 CL	599 a	404 a	8 a	85 b	28 a	9.861
IRGA 417	440 b	361 b	6 b	93 a	26 b	9.837
Significância ²	***	*	*	*	***	ns
PS x Cultivares	**	ns	ns	ns	ns	ns
CV(%)	21	18	4	18	5	11

¹ Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

² ns não significativa, *** Significativa P≤0,001, ** Significativa P≤0,01, * Significativa P≤0,05

Fonte: Kraemer *et al.*, 2009b

Em outro estudo realizado para avaliar o residual de doses e épocas de aplicação da mistura formulada de imazethapyr e imazapic sobre a cultura de arroz irrigado não tolerante semeado em sucessão de um e dois anos após a aplicação dos herbicidas (Tabela 8), os resultados mostram que o residual da mistura formulada de imazethapyr e imazapic reduz o rendimento de grãos da cultivar IRGA 417 quando semeada um ano após a aplicação do herbicida. Sintomas iniciais de toxicidade às plantas de arroz podem ocorrer mesmo transcorridos dois anos da aplicação do herbicida, porém, sem acarretar prejuízos ao rendimento de grãos. Cabe ressaltar que sob condições de temperaturas baixas, má drenagem e conseqüentemente, baixa atividade microbiana, situações que geralmente se encontram as várzeas produtoras de arroz do RS no período de entressafra, o efeito residual do herbicida no solo pode ultrapassar dois anos (MARCHESAN *et al.*, 2010b).

Tabela 8 - Produtividade de grãos de arroz irrigado após um e dois anos de uso da mistura formulada de imazethapyr e imazapic. Santa Maria-RS, 2010.

Doses do herbicida ¹	Safr 2006/07		Safr 2007/08	
	Produtividade de grãos		Produtividade de grãos	
	IRGA 417	IRGA 422CL	IRGA 417	IRGA 422CL
	----- kg ha ⁻¹ -----		----- kg ha ⁻¹ -----	
PRE ²	POS ³	Total		
----- L ha ⁻¹ -----				
D1	0	0	0	
D2	0.75	0	0.75	6,506 ^{ns}
D3	0	1.0	1.0	8,068
D4	1.0	0	1.0	7,515
D5	0.5	0.5	1.0	7,157
D6	0.75	0.5	1.25	7,195
D7	0.75	0.75	1.5	6,706
D8	1.0	0.5	1.5	7,107
D9	1.0	1.0	2.0	7,564
D10	0	2.0	2.0	7,433
Cultivar				
IRGA 417		B 7,250	7,301 ^{ns}	
IRGA 422 CL		A 8,932	7,037	
Média		8,091	7.169	
CV (%)		13,1	13	

¹Mistura formulada de imazethapyr (75 g L⁻¹) + imazapic (25 g L⁻¹) aplicadas nas safras 2004/05 e 2005/06; ²Aplicação em pré-emergência; ³Aplicação em pós-emergência [arroz-vermelho em V₅ (COUNCE *et al.*, 2000)]; ⁴ Não foi realizado a colheita das testemunhas por apresentarem alta infestação de arroz-vermelho, devido o não controle nas duas safras anteriores. *Médias dentro de cada coluna não seguidas da mesma letra diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Marchesan *et al.*, 2010b

O efeito residual dos herbicidas imazethapyr + imazapic pode persistir no solo após o uso em áreas de arroz irrigado. Neste sentido foi realizado um experimento com o objetivo de avaliar alternativas de cultivares e herbicidas para o retorno da produção de arroz não tolerante após o uso dos herbicidas. Avaliaram-se dois sistemas de sucessão; sistema de sucessão 1 - duas safras agrícolas com o uso do sistema Clearfield® e aplicação de imazethapyr + imazapic (75 e 25 g i.a. ha⁻¹) e uma safra com cultivo de arroz não tolerante, com aplicação de quinclorac; e sistema de sucessão 2 - três safras agrícolas com o uso do sistema Clearfield® e aplicação do herbicida na mesma dose especificada anteriormente.

Os sistemas de sucessão de arroz com dois anos de aplicação do herbicida composto pela mistura formulada de imazethapyr + imazapic requerem (Tabela 9), pelo menos, uma safra agrícola

sem o uso do herbicida, para evitar que o seu residual altere a produtividade de grãos de cultivares de arroz não tolerante (AVILA *et al.*, 2010).

Tabela 9 - Produtividade de grãos de quatro cultivares de arroz irrigado semeada em 2006/07 após o uso do sistema Clearfield® em área com dois sistemas de sucessão de cultivo de arroz irrigado e de herbicidas. Santa Maria, RS. 2010.

Cultivar	Produtividade de grãos ----- kg ha ⁻¹ -----	
	Sucessão 1 ^{1/}	Sucessão 2 ^{2/}
BR-IRGA 409	A 8.795 ^{ns}	B 5.121 b
IRGA 417	A 8.620	B 4.989 b
IRGA 422 CL	A 8.632	A 7.277 a
BRS 7 “TAIM”	A 8.609	B 5.088 b
Tratamentos ^{3/}		
Testemunha	8.899 ^{ns}	5.959 ^{ns}
<i>Bispyribac-sodium</i>	8.655	5.981
Clomazone + propanil	8.806	5.728
<i>Cyhalofop-butyl</i>	8.518	5.016
Quinclorac	8.564	5.252
<i>Penoxsulam</i>	8.524	5.776
Média	A 8.663	B 5.619
C.V. %	15,7	

^{1/}Sistema de sucessão de cultivo de arroz irrigado, com cultivo de arroz tolerante com a aplicação de 1,0 L ha⁻¹, do herbicida composto pela mistura formulada de imazethapyr e imazapic (75 + 25 g i.a. L⁻¹), em dois anos agrícolas (2003/04 e 2004/05) e o cultivo de arroz não-tolerante e aplicação do herbicida quinclorac no último ano (2005/06) antes da instalação do experimento; ^{2/}Sistema de sucessão de cultivo de arroz irrigado, com cultivo de arroz tolerante e aplicação de 1,0 L ha⁻¹, do herbicida composto pela mistura formulada de imazethapyr e imazapic (75 + 25 g i.a. L⁻¹), nos três anos agrícolas que antecederam o experimento (2003/04, 2004/05 e 2005/06); ^{3/}Aplicação em pós-emergência com o arroz no estágio V₅ (COUNCE *et al.*, 2000); *Bispyribac-sodium* (48 g i.a. ha⁻¹); *Clomazone* na dose 300 g i.a. ha⁻¹ + *Propanil* (1800 g i.a. ha⁻¹); *Cyhalofop-butyl* (270 g i.a. ha⁻¹), *Quinclorac* (375 g i.a. ha⁻¹) e *Penoxsulam* (48 g i.a. ha⁻¹); ^{ns}Teste F não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro; * Médias seguidas por distintas letras minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Avila *et al.*, 2010

3.5 Na planta e nos grãos

Em função de que alguns agrotóxicos atingem diretamente o órgão da planta de arroz que será consumido, e ao fato do mesmo não receber intenso processamento industrial, torna-se fundamental a análise de resíduos de agrotóxicos nos grãos como uma maneira de garantir a qualidade dos alimentos. Em razão disso o presente experimento objetivou quantificar a presença de resíduos de fungicidas e inseticidas na planta e nos grãos de arroz em condição de grãos cozidos e crus, onde se aplicou fungicidas e inseticidas.

Conforme apresentado na Figura 11 por Teló *et al.*, 2009, na planta (folhas e colmos), os agrotóxicos analisados estão presentes até o 15º dia após sua aplicação, enquanto nos grãos, cozidos ou crus, não há resíduos dos produtos que foram aplicados no estágio R2 e R4. Na casca (Tabela 10), o método utilizado proporcionou a determinação dos agrotóxicos, sendo cypermethrin encontrada em maior concentração.

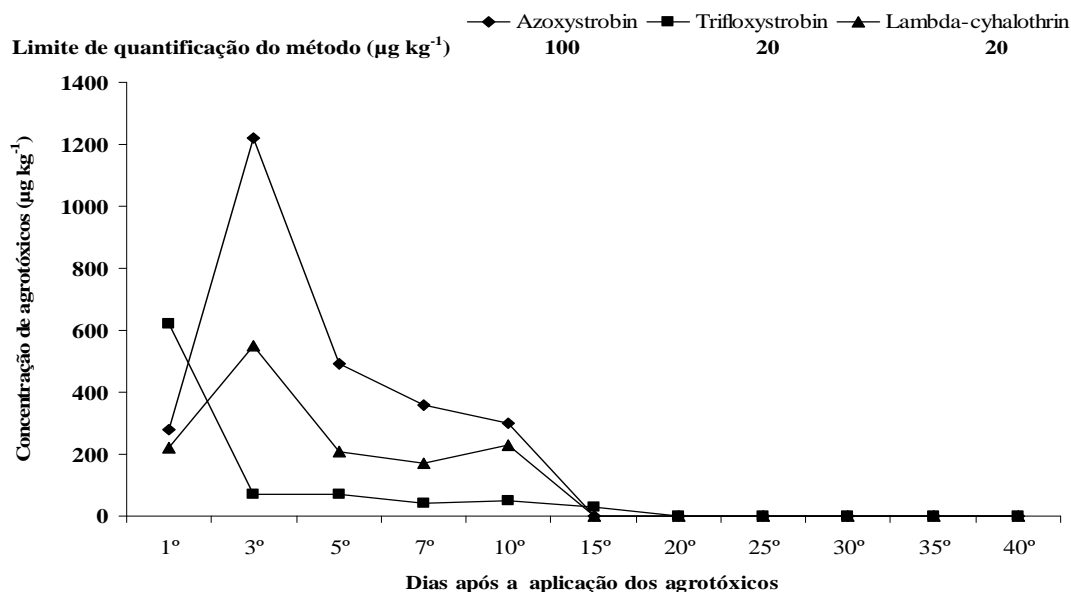


Figura 11- Concentração de agrotóxicos detectados em plantas de arroz irrigado e limite de quantificação do método para cada agrotóxico. Santa Maria-RS, 2009.

Fonte: Teló et al., 2009

Tabela 10- Limite de quantificação do método e concentração de agrotóxicos detectados na casca de arroz, no grão cru (integral e polido) e cozido (integral e polido). Santa Maria-RS, 2009.

Agrotóxicos	Concentração (µg kg ⁻¹)					
	Limite de quantificação do método	Casca do arroz	Grão cru		Grão cozido	
			Integral	Polido	Integral	Polido
Azoxystrobin ¹	20	20	nd	nd	nd	nd
Difenoconazole ¹	20	nd	nd	nd	nd	nd
Azoxystrobin ²	20	30	nd	nd	nd	nd
Difenoconazole ²	20	nd	nd	nd	nd	nd
Cypermethrin ¹	20	120	nd	nd	nd	nd

¹Aplicação no estágio de desenvolvimento R2; ²Aplicação no estágio de desenvolvimento R2+ R4; nd = não detectado

Fonte: Teló et al., 2009

4. MEDIDAS QUE VISAM REDUZIR O EFEITO NÃO DESEJADO DOS AGROTÓXICOS

- Uso racional.
- Uso de agrotóxicos registrados/recomendados pelas subcomissões técnicas da cultura do arroz.
- Utilização de agrotóxicos com menor potencial de impacto no ambiente e em organismos não-alvo e menor persistência no ambiente
- Reforçar as taipas no entorno da lavoura (taipas ronda).
- Utilizar plantas de cobertura do solo na entressafra.

- Construir drenos ao redor da lavoura.
- Plantio direto (semeadura direta) de arroz.
- Preservação de matas ciliares.
- Adoção de vegetação na saída de água das lavouras.
- Adoção de sistemas de reaproveitamento (retorno) da água de saída das lavouras.
- Sistema de irrigação intermitente, principalmente em áreas de maior risco (cuidados).
- Irrigação sem a retirada de água no sistema pré-germinado.

Em função do exposto, reforça-se a necessidade do monitoramento dos agrotóxicos utilizados, com avaliações químicas e biológicas, nos diferentes elos envolvidos com a cadeia alimentar. Destaca-se que os resultados apresentados contemplam fundamentalmente a detecção do princípio ativo do agrotóxico utilizado. No entanto, alguns metabólitos podem ter, igualmente, impacto ambiental negativo. O domínio da metodologia que permita quantificá-los é um dos desafios.

A partir da detecção do produto no ambiente é necessário identificar seu efeito em organismos não alvo. Entre eles encontram-se organismos da comunidade fito, zooplantônica, bentônicos e peixes, presentes em ambientes aquáticos e participantes da cadeia alimentar.

A partir dos efeitos sobre o comportamento destas comunidades pode-se estabelecer parâmetros e limites de tolerância. Este é o grande desafio, pois para a maioria dos agrotóxicos utilizados na lavoura de arroz irrigado do Brasil ainda não se dispõem destes valores referenciais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRA, R. *et al.* Patrones de contaminación por herbicidas en aguas superficiales en una cuenca agrícola. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v. 2, n. 2, p. 7583, 1999.

CREPEAU, K., KUIVILA, K. M. Rice pesticide concentrations in the Colusa basin drain and the Sacramento River, California, 1990-1993. **Journal Environmental Quality**, v. 29, p. 926-935, 2000.

GRÜTZMACHER, D.D. *et al.* Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, p. 632-637, 2008.

HERMES, L.C. *et al.* Dissipação do herbicida clomazone em arroz irrigado em sistema pré-germinado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 1., Pelotas, 1999. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1999. p. 685-688.

KRAEMER, A.F. *et al.* Lixiviação do imazethapyr em solo de várzea sob dois sistemas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1660-1666, 2009.

KRAEMER, A.F. *et al.* Persistência dos herbicidas imazethapyr e imazapic em solo de várzea sob diferentes sistemas de manejo. **Planta Daninha**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 581-588, 2009.

LAVY, T.L. *et al.* Environmental implications of pesticides in rice production. In: RICE RESEARCH STUDIES, 1997. Arkansas Agricultural Experimental Station. Fayetteville, Arkansas, Research Series 460, p. 63-71, 1998.

MACEDO, V.R.M. Qualidade da água do rio Gravataí usada na irrigação na estação experimental do arroz em Cachoeirinha-RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: IRGA, 2009. p. 1795-178.

MACHADO, S. L. de O. *et al.* Persistência de alguns herbicidas em lâmina de água de lavoura de arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 2; e REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 24., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: IRGA, 2001. p. 775-777.

MACHADO, S. L. O. *et al.* Persistência de herbicidas na água de irrigação no arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 3.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 25., 2003, Balneário Camboriú. **Anais...** Camboriú: EPAGRI, 2003. p. 92-694.

MACHADO, S.L. de O. *et al.* Lavoura arrozeira e recursos hídricos. **Ciência e Ambiente**, Santa Maria, v. 27, p. 97-106, 2003.

MARCHESAN, E. *et al.* Dispersão de herbicidas nas águas da bacia hidrográfica do Rio Vacacaí e Vacacaí-Mirim, no período de cultivo do arroz. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA, 1., REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO ARROZ, 7., 2002, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: EMBRAPA/ABRARROZ/EPAGRI, 2002. p.670-673.

MARCHESAN, E. *et al.* Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, [no prelo], 2010a.

MARCHESAN E. *et al.* Residual do herbicida composto pela mistura formulada de imazethapyr e imazapic aplicado em diferentes doses sobre o arroz irrigado (*Oryza sativa*) semeado um e dois anos após a aplicação. **Planta Daninha**, [no prelo], 2010b.

MARCHESAN, E. *et al.* Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 2, p. 131-137, 2007.

MATTOS, M.L.T. *et al.* Monitoramento ambiental do glifosate e do seu metabólico (ácido aminofosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 2, p. 145-154, 2002.

MATTOS, M.L.T. *et al.* Dissipação dos herbicidas imazetapir e imazapic em solo, água e sedimentos de lavoura de arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: IRGA, 2009. p. 159-161.

MARTINI, L.F.D. **Transporte de agrotóxicos e uso de água na lavoura arrozeira em diferentes manejos de irrigação**. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. 2010.

MARCOLIN, E. *et al.* Persistencia do herbicida imazethapyr na lamina de agua em tres sistemas de cultivo de arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 3., REUNIAO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 25., 2003. Balneário Camboriú. **Anais...** Itajaí: EPAGRI, 2003, p.686-688.

NOLDIN, J.A. *et al.* Persistência do herbicida clomazone em arroz irrigado em sistema pré-germinado. In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 22, Balneário Camboriú, 1997. **Anais...** Itajaí: EPAGRI, 1997. p.363-364.

RESGALLA JR., C. *et al.* Risk analysis of herbicide quinclorac residues in irrigated rice areas, Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology**, New York, v.16, p.565-571, 2007.

REIMCHE, G.B. **Impacto de agroquímicos usados na lavoura de arroz irrigado sobre a qualidade da água de irrigação e na comunidade zooplânctônica**. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. 2010.

SANTOS, F.M. *et al.* Persistência dos herbicidas imazethapyr e clomazone em lâmina de água do arroz irrigado. **Planta Daninha**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 875-881, 2008.

SILVA, D.R.O. *et al.* Ocorrência de agrotóxicos usados na lavoura de arroz irrigado em mananciais hídricos subterrâneos do Sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: IRGA, 2009. p. 167-170.

SILVA, D.R.O. *et al.* Presença de agrotóxicos de regiões orizícolas no RS e SC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: IRGA, 2009. p. 171-174.

SILVA, D. R. O. *et al.* Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2383-2389, dez., 2009.

SUDO, M. *et al.* Concentration and loading pesticides residues in Lake Biwa basin (Japan). **Water Research**, New York, v. 36, p. 315-329, 2002.

STUMPF, M. *et al.* Organic residues in lake and drinking water from the Lagoa de Juturnaiba (Regiao dos Lagos - Rio de Janeiro, Brazil). **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 8, n. 5, p. 509-514, 1997.

TELÓ, G.M. *et al.* Resíduos de fungicidas e inseticidas nos grãos e plantas de arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: IRGA, 2009. p. 464-467.

WEGMAN, R. C. C., de KORTE, G. A. L. Aromatic amines in surface waters of the Netherlands. **Water Research**, New York, v. 15, p. 391-394, 1991.

ZANELLA, R. *et al.* Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Chromatographia**, v. 55, n. 9/10, p. 573-577, 2002.