

Ação do atrazine sobre os teores de clorofila e sintomatologia foliar de *Salvinia auriculata*.

Geovane Campanha Gonçalves¹; José Barbosa dos Santos²; Darlianne Nadine da Silva¹; Wesley Ribeiro Pires¹; Ivana Cristina Ferreira Santos¹

¹UNIVALE – FACS – Ciências Biológicas. ²UNIVALE - FAAG – Agronomia. Cx. Postal 295, 35020-220, Governador Valadares, MG

RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar os teores de clorofila e a sintomatologia foliar de *Salvinia auriculata* sob efeito do herbicida atrazine. Para isso, exemplares dessa macrófita foram cultivadas em bandejas plásticas contendo 4 litros de solução de Hoagland diluída previamente tratada com concentrações do herbicida atrazine variando de 0,01 a 10,0 mg L⁻¹, além de uma testemunha sem herbicida. Foram cultivadas aproximadamente 8,5 g de matéria fresca de plantas em cada bandeja. Aos 3, 12 e 16 dias da incubação, amostras de 500 mg de folhas em cada bandeja foram retiradas para quantificação das clorofilas *a*, *b* e total. Na última época também foi quantificada a massa fresca das plantas além da porcentagem de intoxicação em função das concentrações do herbicida. De maneira geral as concentrações de atrazine afetaram o teor das clorofilas, massa fresca de plantas, além de causar intoxicação visual. Após três dias de exposição ao atrazine os teores de clorofila *a*, *b* e total aumentaram com o aumento da concentração do herbicida. Contudo, aos 12 dias da incubação observou-se acentuado decréscimo nos teores das clorofilas *a* e total, e estabilização para *b*. Aos 16 dias, observou-se novamente decréscimo para todas as clorofilas avaliadas, de maneira mais acentuada para clorofila *a*. Para a produção de massa fresca, observou-se acentuado decréscimo com o aumento da concentração do herbicida. Pode-se concluir que *S. auriculata* é sensível a baixas concentrações do atrazine, sendo, o teor de clorofila, características fisiológica sensível à presença do herbicida na concentração de 0,01 mg L⁻¹.

Palavras-chave: Clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, macrófita aquática.

ABSTRACT – Atrazine action on chlorophyll content and foliar sintomatology of *Salvinia auriculata*

This study was carried out in order to evaluate chlorophyll content and foliar sintomatology of *Salvinia auriculata* under atrazine effect. Samples were put in trays with 4 L of Hoagland, diluted and previously treated with atrazine concentrations varying

from 0,01 to 10,0 mg L⁻¹, beyond a control without herbicide. Approximately 8.5 g of fresh matter was cultivated in each tray. After 3, 12 and 16 days of incubation, samples of 500mg of leaves were retired from each tray to quantify *a*, *b* and total chlorophyll. At the last time, fresh matter of plants, and intoxication rate because of herbicide concentrations were also quantified. In general, atrazine concentration affected chlorophyll content, fresh matter of plants, and they caused visual intoxication. Chlorophyll *a*, *b* and total content increased with higher herbicide concentration after 3 days of exposition, however, at 12 days of incubation, *a* and total content decreased, while *b* content stabilized. After 16 days, all evaluated chlorophyll decreased again, being higher to chlorophyll *a*. Fresh matter production decreased with higher herbicide concentration. It can be concluded that *S. auriculata* is sensitive to low concentrations of atrazine, being chlorophyll content, one physiological characteristic that is sensitive to this herbicide at 0,01 mg L⁻¹.

Key words:. Clhorophyll *a*, Clhorophyll *b*, Clhorophyll total, aquatic macrophyte

INTRODUÇÃO

No contexto da influência das atividades antrópicas na qualidade das águas, a agricultura é tida como a principal consumidora e uma das principais poluidoras dos recursos hídricos (Ongley, 2001). O uso indiscriminado de pesticidas na agricultura favorece o aparecimento de impactos ambientais negativos, uma vez que estes tendem a reter no solo e muitas vezes são lixiviados até atingirem ambientes aquáticos. Dentre os inúmeros pesticidas utilizados, o grupo dos herbicidas tem se destacado dos demais. Eles são empregados no controle de plantas daninhas que competem com as culturas desejadas. Nos Estados Unidos e na Europa, os herbicidas atrazine e alachlor estão entre os pesticidas mais freqüentemente detectados em amostras de água do subsolo (Ritter, 1990). O atrazine é um herbicida da família das s-triazinas, utilizado em culturas de monocotiledôneas como o milho, cana-de-açúcar e sorgo, na qual se incluem os compostos que apresenta na sua estrutura química um anel aromático hexamérico, simétrico, constituído por três átomos de carbono e três átomos de azoto em posições alternadas. Os herbicidas da família das s-triazinas subdividem-se em três grupos: clorotriazinas, metiltiotriazinas e metoxitriazinas. Esta classificação é feita de acordo com o grupo substituinte da posição 2 do anel que poderá ser um cloro (Cl)

(clorotriazinas), um grupo SCH₃ (metiltiotriazinas) ou OCH₃ (metoxitriazinas). Na molécula do atrazine o grupo substituinte é um Cl, o que leva à inclusão deste herbicida no grupo das clorotriazinas. (Biradar & Rayburn, 1995). À semelhança do que se verifica para outras s-triazinas, o atrazine atua inibindo a fotossíntese, em particular ao nível do fotossistema II, promovendo o bloqueio do transporte de elétrons. As plantas sensíveis ao atrazine sofrem clorose (amarelecimento das folhas) a qual conduz à necrose dos tecidos (Biradar & Rayburn, 1995). Nas espécies tolerantes ao atrazine, como é o caso do milho, o herbicida é eficientemente metabolizado em formas não tóxicas, principalmente pela ação de benzoxazinonas (Prade *et al.*, 1998; Weller, 2003). Algumas espécies de plantas são capazes de absorver herbicidas bem como grande variedade de poluentes tóxicos e degradá-los em agentes não tóxicos, processo conhecido como fitorremediação. Entretanto, existem outras espécies vegetais que são altamente sensíveis à presença de substâncias tóxicas, tais plantas são utilizadas no monitoramento da qualidade da água como bioindicadoras de poluição. A *Salvinia auriculata*, uma macrófita livre e flutuante muito comum em água doce, sob condições favoráveis é rapidamente disseminada por propagação vegetativa, colonizando extensas superfícies de água em um tempo reduzido. As elevadas taxas de crescimento e a sensibilidade das plantas de *Salvinia* a diferentes agentes tóxicos, têm sido mencionadas como características que possibilitam a essa espécie atuar tanto como descontaminadora (Guimarães, 2006), como “sentinela” e bioindicadora de poluição em ecossistemas aquáticos (Gardner & Al-Hamdani, 1997). Entre outros fatores, a medição da clorofila em folhas é utilizada para predizer seu nível nutricional, devido ao fato da quantidade desse pigmento correlacionar-se positivamente com a concentração de alguns nutrientes, destacando-se o nitrogênio (Smeal & Zhang, 1994; Argenta *et al.*, 2001). Além disso, as clorofilas são promotoras da canalização da energia da luz em energia química. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do herbicida atrazine nos teores de clorofila a, b e total, na sintomatologia foliar e também na biomassa em plantas de *Salvinia auriculata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Salvinia auriculata* foram coletadas em ambiente aquático no Horto Botânico da Universidade Vale do Rio Doce - UNIVALE, Governador Valadares, MG, em

Outubro de 2007. O experimento foi montado no Laboratório de Ecologia da UNIVALE em bandejas retangulares, cada uma contendo em média 8,5 gramas de massa fresca. As plantas passaram por um período de aclimatação (oito dias) nas bandejas em solução diluída de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), antes de serem submetidas aos tratamentos. Aplicou-se por meio de seringa o herbicida atrazine nas seguintes concentrações: 0,0; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 mg/L⁻¹. O experimento foi delineado inteiramente ao acaso com cinco repetições (bandejas) por tratamento, num total de 25 unidades experimentais. Aos 3, 12 e 16 dias após a incubação, amostras de 500 mg de folhas das plantas, selecionadas ao acaso, eram retiradas para quantificação das clorofilas *a*, *b* e total. Paralelamente era realizada análise das modificações visuais das folhas. Para extração do teor de clorofila utilizou-se acetona 80%, sendo, após procedimento de purificação, quantificadas em espectrofotômetro de feixe simples modelo Coleman 35-D. Para as análises, as folhas colhidas em cada bandeja eram pesadas em balança de precisão, maceradas no almofariz e homogeneizadas em acetona, até a total desintegração. Os líquidos homogeneizados foram filtrados nos erlemmeyers e depositados nos tubos Falcon previamente recobertos por papel alumínio. O volume dos extratos foi completado com acetona 80% e, em seguida, realizadas as leituras dos extratos. Com auxílio de filtros, nos comprimentos de onda 663 e 645 nm, foram obtidos o valor de absorbância de cada amostra. Para determinar os teores das clorofilas, foram utilizadas as seguintes equações (segundo Arnon, 1949): clorofila *a* (µg mL⁻¹) = 12,7 A₆₆₃ - 2,69 A₆₄₅; clorofila *b* (µg mL⁻¹) = 22,9 A₆₄₅ - 4,68 A₆₆₃ e clorofila total (µg mL⁻¹) = 20,2 A₆₄₅ + 8,02 A₆₆₃. Ao final do período de incubação (16 dias) realizou-se a avaliação visual de sintomas por meio de escala de notas variando de zero (ausência de sintomas) a 100 (morte total das plantas), além da quantificação final de massa fresca. Os dados foram submetidos à análise de variância sendo as médias, quando significativas, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De maneira geral, as concentrações de atrazine superiores a 0,1 mg L⁻¹ causaram os efeitos mais negativos sobre o teor das clorofilas, massa fresca de plantas e intoxicação visual. Após três dias de exposição ao atrazine, observou-se aumento nos

teores de clorofila *a* com o aumento da concentração do herbicida. Apesar da baixa variação (aproximadamente $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$), a resposta fisiológica em aumento de clorofila *a* pode significar necessidade da compensação pelo estresse ocasionado na presença do herbicida. O atrazine ao se ligar ao sítio da proteína transmembrana D1, essencial à transferência de energia entre PSII e complexo citocromo b6f, promove o bloqueio dos elétrons entre os fotossistemas, ocasionando maior atividade no centro de reação do fotossistema II onde a concentração da clorofila *a* é maior (Weller, 2003). Considerando as avaliações posteriores, aos 12 e 16 dias, percebe-se o declínio nos níveis de clorofila *a*, de maneira mais acentuada nas concentrações de 0,1; 1,0 e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 1). Considerando os danos causados ao complexo dos fotossistemas em função de estresses que levam a fotoinibição, alguns trabalhos sugerem linhas de defesa pela planta que variam desde o aumento da produção de clorofilas, mecanismos de supressão do excesso de energia (calor e fluorescência, por exemplo) e sistema de remoção de produtos fitotóxicos, como carotenóides e enzimas (superóxido dismutase) (Garstka *et al.*, 2004; Küster & Altenburger, 2007). Essa significativa diminuição continua evidente e mais visível com o tempo de exposição, chegando as plantas a apresentarem, sob efeito da maior concentração do herbicida, 50% do teor de clorofila *a* observado na planta testemunha (Figura 1). Observando os dados da Figura 2, nota-se que os teores de clorofila *b* seguiram comportamento semelhante aos observados para clorofila *a*. Ao final dos três primeiros dias após a aplicação do herbicida, os níveis de clorofila *b* aumentaram com a concentração do produto. O aumento proporcional dos níveis de clorofila *b* aos três dias após aplicação do herbicida é maior do que aquele observado para clorofila *a*. A clorofila *b*, presente nas folhas de plantas superiores e nas algas verdes, apresenta uma coloração verde amarelada, sendo que, seu teor é de cerca de 1/4 do teor da clorofila *a* (Raven, 1996). Provavelmente, o estresse causado pela ação do herbicida na planta tenha promovido essa semelhança no comportamento fisiológico das clorofilas. As clorofilas *a* e *b* atuam em conjunto no processo de fotossíntese, uma vez que a clorofila *a* é o principal pigmento, sendo ela a molécula capaz de se excitar e emitir elétrons. A clorofila *b* funciona como pigmento acessório, apenas recebendo e emitindo energia luminosa para a clorofila *a* nos centros de reação dos complexos antena (Taiz, 2004). Os níveis

de clorofila total (Figura 3) mantiveram-se consideravelmente superiores aos níveis de clorofila *a* e *b*. Mas, esses teores de clorofila, quando comparados de acordo com o tempo de exposição e com a concentração de herbicida, apresentaram um comportamento bastante semelhante. Uma vez que nos primeiros dias de contato com o atrazine, os valores de clorofila total se elevaram bastante em comparação com o grupo controle. E nos dias subseqüentes, esses valores decresceram significativamente, chegando a apresentar valores de $2,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ para as concentrações de 1,0 e 10,0 mg L^{-1} . Alterações visuais nas folhas da *S.auriculata* começaram a aparecer após 6 dias de exposição das plantas ao herbicida. Após 10 dias de contato das plantas ao herbicida, os sintomas apresentaram-se mais evidentes. Observou-se nível de intoxicação já a partir da menor concentração utilizada do atrazine (Figura 4). Foi observado um decréscimo bastante acentuado nos valores de massa fresca das plantas tratadas com o herbicida nas concentrações 0,1; 1,0 e 10,0 mg/L^{-1} (Figura 5). Segundo Guimarães (2006), amostras de *S. auriculata* quando submetidas a soluções contaminadas por atrazine, mesmo em baixas concentrações (0,1 mg L^{-1}), reduzem o ganho de massa, quando comparada a outras macrófitas. De maneira geral, a presença de atrazine em concentrações acima de 0,1 mg L^{-1} na solução aquosa, pode ser sugerida como um fator essencial na síntese e degradação das moléculas de clorofila. Ainda, *S. auriculata* pode ser recomendada em programas de monitoramento de águas para detecção do atrazine, sendo, o teor de clorofila, característica passível de avaliação.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa

LITERATURA CITADA

ARGENTA, G.; et al. Relationship of reading of portable chlorophyll meter with contents of extractable chlorophyll and leaf nitrogen in maize. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.13, p.158-167, 2001.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949.

BIRADAR, D.P.; RAYBURN, A.L. Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies, **J. Environ. Qual.** v.24, p.1222-1225, 1995.

GARDNER, J.L.; AL-HAMDANI, S.H. Interactive effects of aluminum and humic substances on salvinia. **J. Aquatic Plant Manag.**, v.35, p.30-34, 1997.

GARSTKA, M., NEJMAN, P.; ROSIAK, M. The action of oxygen on chlorophyll fluorescence quenching and absorption spectra in pea thylakoid membranes under the steady-state conditions. **J. Photochem. Photobiol.**, v.77, p.79-92, 2004.

GUIMARÃES, F.P. **Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa.** Dissertação (mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006, 70p.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The waterculture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, 1950. 39 p.

KÜSTER, A.; ALTENBURGER, R. Development and validation of a new fluorescence-based bioassay for aquatic macrophyte species **Chemosphere**, v.67, p.194-201, 2007.

ONGLEY, E.D. Controle da poluição da água pelas atividades agrícolas. Campina Grande: UFPB, 2001. 92p. FAO. **Irrigação e Drenagem**, 55.

PRADE, L.; HUBER, R.; BIESELER, B. Structures os herbicides em complex with their detoxifying enzyme glutathione-S-transferase explanations for the selectivity of the enzyme in plants. **Structure**, v.6, p.1445-4452, 1998.

RAVEN, P. H.; et al. **Biologia Vegetal**. 5^a ed. Rio de Janeiro, RJ, 1996, 727p.

RITTER, W. F. Pesticide contamination of ground water in the United States - a review. **J. Environ. Sci. Health**, v. 25, p.1-29, 1990.

SMEAL, D.; ZHANG, H. Chlorophyll meter evaluation for nitrogen management in corn. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.25, p.1495-1503, 1994.

TAIZ, L. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

WELLER, S. Photosystem II inhibitors. In: **Herbicide action course**. West Lafayette: Purdue University, 2003. p. 131-184.

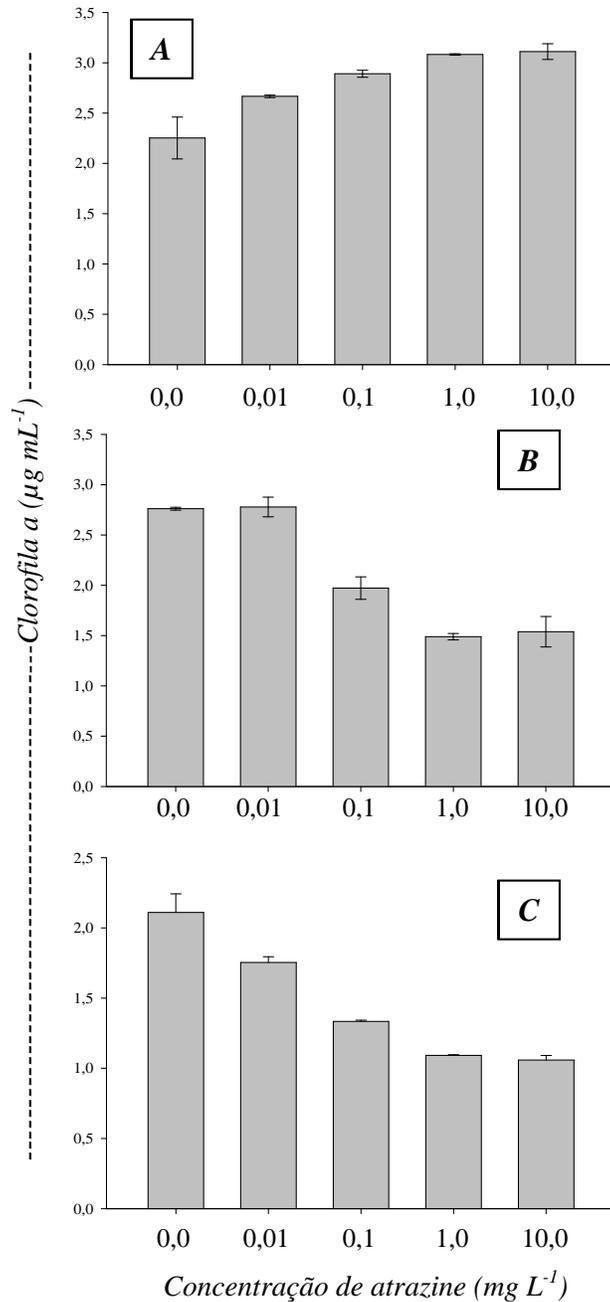


Figura 1 – Teores de clorofila “a” quantificados em plantas de *Salvinia auriculata*, após 3, 12 e 16 dias (A, B e C, respectivamente) de exposição ao herbicida atrazine em diferentes concentrações (mg L⁻¹). Governador Valadares, 2007

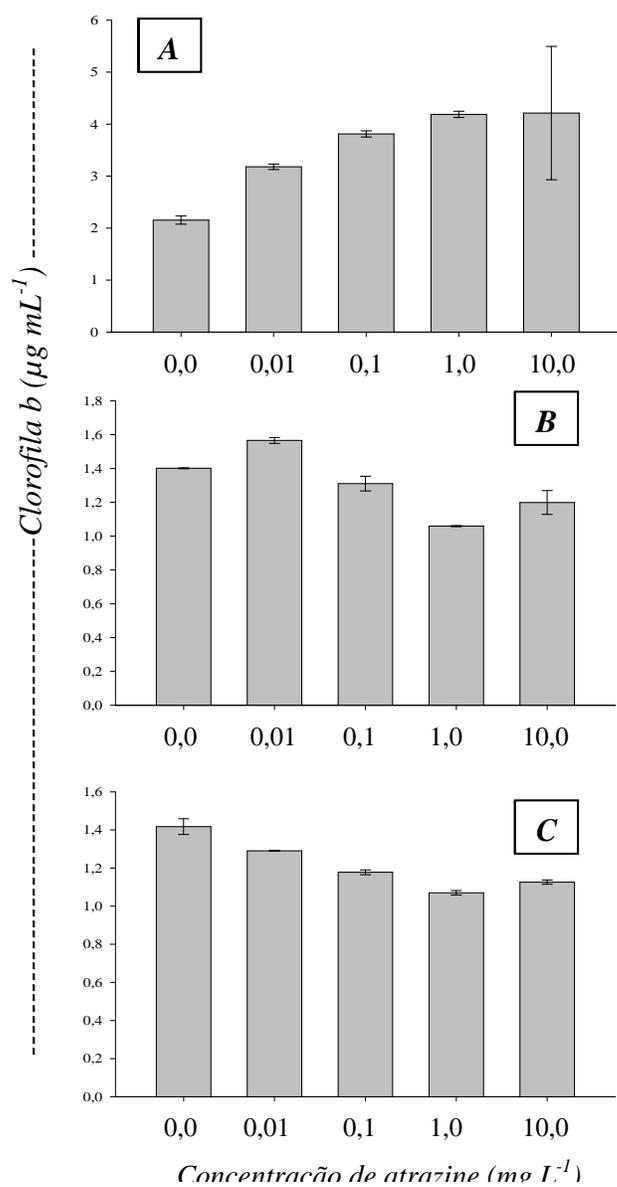


Figura 2 – Teores de clorofila “b” quantificados em plantas de *Salvinia auriculata*, após 3, 12 e 16 dias (A, B e C, respectivamente) de exposição ao herbicida atrazine em diferentes concentrações (mg L^{-1}). Governador Valadares, 2007

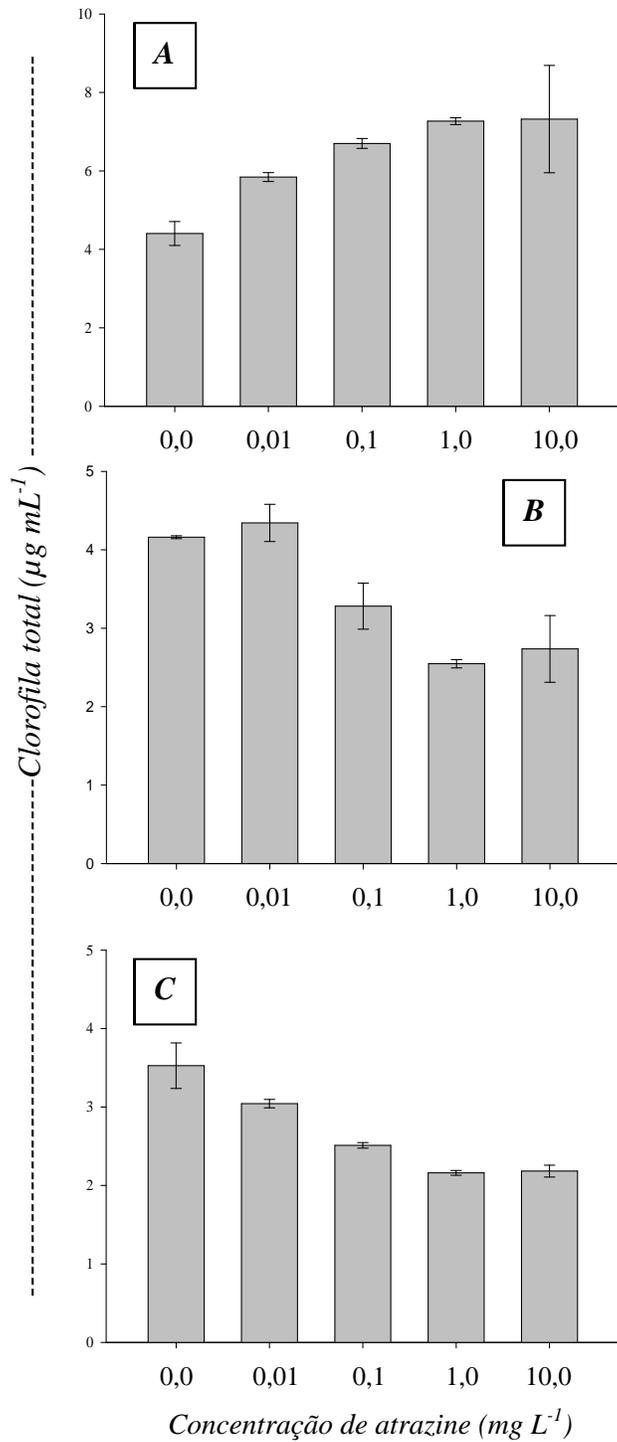


Figura 3 – Teores de clorofila “total” quantificados em plantas de *Salvinia auriculata*, após 3, 12 e 16 dias (A, B e C, respectivamente) de exposição ao herbicida atrazine em diferentes concentrações (mg L^{-1}). Governador Valadares, 2007

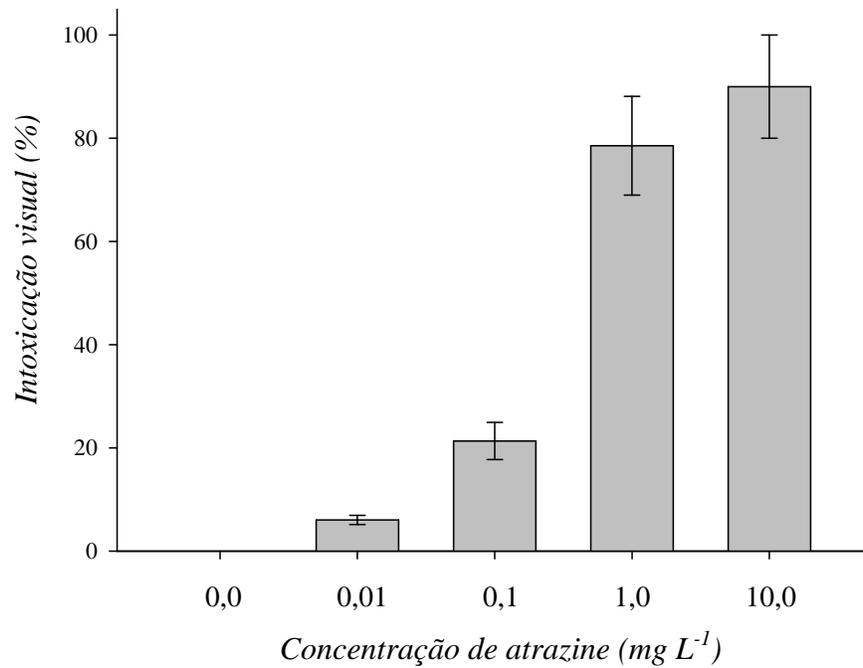


Figura 4 – Intoxicação visual apresentada por plantas de *Salvinia auriculata* em meio contendo o herbicida atrazine em diferentes concentrações (mg L⁻¹). Avaliação realizada 16 dias após a aplicação. Governador Valadares, 2007

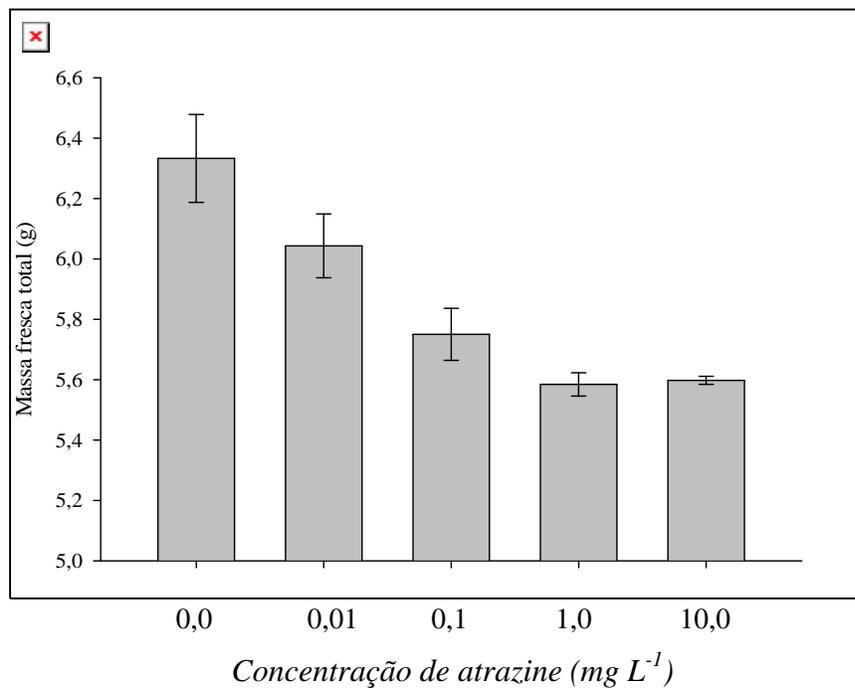


Figura 5 – Massa fresca total de plantas de *Salvinia auriculata* 16 dias após aplicação do herbicida atrazine em diferentes concentrações (mg L⁻¹). Governador Valadares, 2007