

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA”
FILHO FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ORGANISMOS
AQUÁTICOS E TERRESTRES AO TRICLOPYR**

Joani Cristina Hungaro Aires da Gama Bastos

Engenheira Agrônoma

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ORGANISMOS
ÁQUATICOS E TERRESTRES AO TRICLOPYR**

Joani Cristina Hungaro Aires da Gama Bastos

Orientador: Prof. Dr. Dagoberto Martins

co-orientador: Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

2015

B327a Bastos, Joani Cristina Hungaro Aires da Gama
Avaliação da sensibilidade de organismos aquáticos e terrestres
ao triclopyr / Joani Cristina Hungaro Aires da Gama Bastos. – –
Jaboticabal, 2015
iv, 62 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Dagoberto Martins

Coorientador: Robinson Antonio Pitelli

Banca examinadora: Silvano Bianco, Fernando Tadeu de
Carvalho, Ricardo Victória Filho, Marcos Antonio Kuva

Bibliografia

1. Bioindicadores. 2. Herbicida. 3. Plantas indicadoras. 4.
Resíduos. 5. Risco ambiental. 6. Toxicidade. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.95.028

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOANI CRISTINA HUNGARO AIRES DA GAMA BASTOS - nascida em São José do Rio Preto – SP no dia 15 de outubro de 1977, filha de João Roberto Coelho Aires da Gama Bastos e Elizabeth Aparecida Húngaro Aires da Gama Bastos, possui graduação em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campos Ilha Solteira (2005), onde foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e desenvolveu pesquisa com arroz, preparo de solo e nutrição de plantas. Realizou estágio na Usina da Pedra, entre outras atividades. Em agosto de 2008 concluiu o curso de mestrado pelo Programa de Ciência do Solo na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus Jaboticabal. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), desenvolvimento e pesquisa na área de Fertilidade do Solo, na linha de pesquisa de Nutrição e adubação de plantas. Iniciou o doutorado em agosto de 2011, desenvolveu pesquisa sobre a contaminação do ambiente aquático e terrestre por herbicidas.

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a Deus, pela oportunidade de evoluir. A minha querida e amada mãe **Elizabeth** e ao meu amado e saudoso pai **João Roberto** por terem-me proporcionado a vida e pelo exemplo honestidade, dedicação e amor incondicional, e aos meus irmãos **Paulo e Estevan**, pela amizade, amor, companheirismo e proteção.

AGRADECIMENTO

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por ter me acolhido no meu curso de Doutorado;

Ao curso de Pós–Graduação em Agronomia “Produção Vegetal” da FCAV/UNESP, Campus Jaboticabal, pela oportunidade e contribuição científica;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Aos Professores Doutores Robinson Antonio Pitelli e Dagoberto Martins pela orientação sempre eficiente e construtiva, pelo exemplo de profissionalismo e pela paciência e compreensão nas horas difíceis;

Aos membros das bancas examinadoras de qualificação e defesa pelas sugestões;

Ao Prof. Dr. Claudinei Cruz, por ter me auxiliado e ajudado no desenvolvimento dos trabalhos realizados no NEPEAM;

Aos meus amigos do NEPEAM: Adilson, Alfredo, Aline, Cynthia, Edson, Lê, Luís, Nathalia, Neto, Patrícia, Roberto, Ronaldo, Taise, pela convivência e colaboração para o desenvolvimento do meu trabalho de doutorado;

Aos meus amigos e irmãos Igor Cruz Malaspina e Ana Paula Seixas por todo companheirismo e lealdade;

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Ecotoxicologia dos herbicidas	3
2.2. Ensaio ecotoxicológicos	5
2.3. Triclopyr	8
2.4. Eficácia do triclopyr em plantas aquáticas	10
2.5. Plantas indicadoras de resíduos do triclopyr no solo	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Determinação da toxicidade aguda em organismos bioindicadores	15
3.1.1. Manutenção e aclimação dos organismos bioindicadores	15
3.1.2. Testes preliminares e de sensibilidade	16
3.1.3. Toxicidade aguda para <i>Daphnia magna</i>	16
3.1.4. Toxicidade aguda para <i>Lemna minor</i> e <i>A. caroliniana</i>	17
3.1.5. Toxicidades aguda para <i>P. canaliculata</i> e <i>H. eques</i>	18
3.2. Classificação da toxicidade aguda para o triclopyr	18
3.3. Classificação do risco de intoxicação ambiental do triclopyr	19
3.4. Eficácia do triclopyr no controle de plantas aquáticas	21
3.5. Plantas Indicadoras de resíduos do triclopyr no solo	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.1. Determinações da toxicidade aguda CL50 ou CE50 48h/ 7 d para os organismos bioindicadores	24
4.2. Classificação do risco de intoxicação ambiental do triclopyr	31
4.3. Determinação da eficácia do triclopyr em plantas aquáticas	36
4.4. Determinação das plantas indicadoras do triclopyr no solo	42
5. CONCLUSÃO	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ORGANISMOS AQUÁTICOS E TERRESTRES AO TRICLOPYR

RESUMO - O uso inadequado de herbicidas como o triclopyr pode gerar resíduos no solo e na água que podem colocar em risco o equilíbrio do meio ambiente. Para compreender os efeitos deste herbicida no meio ambiente, o presente tem como objetivo classificar o triclopyr pela sua toxicidade aguda para cinco espécies aquáticas, selecionar espécies não alvo para o monitoramento ambiental desta molécula com base em três classificações de risco de intoxicação ambiental, selecionar plantas indicadores da presença de resíduos do herbicida no solo e se ele é seguro para ser utilizado no controle de macrófitas. Para a toxicidade aguda de organismos não alvos, foram realizados ensaios de toxicidade aguda com o mato grosso (*Hypessobrycon eques*), caramujo (*Pomacea canaliculata*), *Azolla caroliniana*, *Lemna minor* e *Daphnia magna*. O risco de intoxicação ambiental foi classificado de acordo com três classificações, que foi calculado pela divisão entre o valor da concentração ambiental estimada (mg L^{-1}) e pela CL50 ou CE50 (mg L^{-1}) para cada organismo não alvo. Para a sua presença no solo foram realizados ensaios em sala aclimatada com as espécies pepino (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e rabanete (*Raphanus sativus*) nas concentrações de 0,0; 0,5 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 mg L^{-1} . a avaliação da fitotoxicidade das plantas foram realizadas no 3º, 7º, 11º e 14º dia após aplicação e no 14º dia foi realizada a avaliação da altura das plantas e matéria seca total. A avaliação da eficácia do triclopyr foi realizada em casa de vegetação, as doses utilizadas foram 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 L ha^{-1} , as espécies utilizadas foram *Myriophyllum aquaticum*, *Nymphaeaceae indica* e *Limnobium laevigatum*. A CI50 e CE50, 48h para o triclopyr foi de 0,61 e 0,62 mg L^{-1} para *H. eques* e *D. magna* respectivamente, para *P. canaliculata*, *A. caroliniana* e *L. minor* a CE50, 7 dias foram de 4,67; 10,52 e 6,95 mg L^{-1} , respectivamente, classificando-se como moderadamente tóxico para *L. minor*, *A. caroliniana* e *P. canaliculata*, como alta ou altamente tóxico para *H. eques* e *D. magna*. As espécies *C. sativus*, *S. lycopersicum* e *R. sativus* podem ser utilizadas como plantas indicadoras da presença de resíduos do triclopyr no solo e a avaliação da fitotoxicidade visual é o sintoma mais característico para identificação do resíduo. O triclopyr pode ser utilizado no controle de macrófitas, pois as concentrações que são eficazes não apresentam risco de intoxicação ambiental.

Palavras-chave: bioindicadores, herbicidas, plantas indicadoras, resíduos, risco ambiental, toxicidade.

AQUATIC ORGANISMS SENSITIVITY ASSESSMENT AND LAND TO TRICLOPYR

ABSTRACT - Improper use of herbicides such as triclopyr may generate residues in soil and water that can endanger the balance of the environment. To understand the effects of this herbicide in the environment, this aims to classify the triclopyr for its acute toxicity to five aquatic species, select non-target species for the environmental monitoring of this molecule based on three environmental poisoning risk ratings, select plants indicators of the presence of herbicide residues in the soil and if it is safe to be used for controlling weeds. For acute toxicity to non-target organisms were conducted acute toxicity tests with the Mato Grosso (*Hyphessobrycon eques*), snail (*Pomacea canaliculata*), *Azolla caroliniana*, *Lemna minor* and *Daphnia magna*. The risk of environmental poisoning has been classified according to three classifications, which was calculated by dividing the value of the estimated environmental concentration (mg L^{-1}) and the CL50 or CE50 (mg L^{-1}) for each non-target organism. For their presence in the soil tests were conducted at room acclimatized to the species Cucumber (*Cucumis sativus*), tomato (*Solanum lycopersicum*) and radish (*Raphanus sativus*) at concentrations of 0.0; 0.5 1.0; 2.5; 5.0 and 7.5 mg L^{-1} , the evaluation of the phytotoxicity of the plants were carried out on the 3rd, 7th, 11th and 14th day after application and after 14 days an assessment was made of plant height and total dry matter. Assessing the effectiveness of triclopyr was conducted in a greenhouse, the doses used were 0.0; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 L ha^{-1} , and species used were *Myriophyllum aquaticum*, *Nymphaeode indica* and *Limnobium laevigatum*. The CL50 and CE50 for 48h triclopyr was 0.61 and 0.62 mg L^{-1} for *H. eques* and *D. magna* respectively, *P. canaliculata*, *A. caroliniana* and *L. minor* CE50, 7 days were 4.67; 10.52 and 6.95 mg L^{-1} , respectively, ranking as moderately toxic to *L. minor*, *A. caroliniana* and *P. canaliculata* as high or highly toxic to *H. eques* and *D. magna*. The species *C. sativus*, *S. lycopersicum* and *R. sativus* can be used as an indicator of the presence of plant triclopyr residues in soil and visual assessment of phytotoxicity is the most characteristic symptom for identifying residue. The triclopyr can be used for controlling weeds because the concentrations that are effective no risk of environmental poisoning.

Keywords: bioindicators, herbicides, indicator plants, waste, environmental risk, toxicity

1. INTRODUÇÃO

A utilização dos herbicidas fora das recomendações técnicas pode gerar acúmulo de resíduos nocivos na água e no solo. A permanência destes compostos por mais tempo do que o necessário para a execução de suas ações tem provocado diversos impactos ao meio ambiente (BITTENCOURT, 2004; LUCHINI; ANDRÉA, 2000) e a consequente adulteração provocada em solos e suprimentos aquíferos, tem sido objeto de constantes estudos e discussões (LUCHINI; ANDRÉA, 2000).

Os herbicidas por apresentar alta persistência no solo e seus resíduos por poderem sofrer diversas interações, apresentam um maior potencial de contaminação do meio ambiente (MELO et al., 2010), com isso é importante que seus efeitos biológicos sejam determinados.

Os herbicidas mimetizadores das auxinas como o triclopyr pode causar sérios problemas ambientais como a contaminação do solo, da água e da microbiota do solo (INOUE et al., 2003), Assim, estudos da dinâmica deste herbicida no solo são importantes para prever os riscos de contaminação das águas e os efeitos dos seus resíduos em culturas e organismos não alvos.

Uma das formas de se identificar a presença dos resíduos dos herbicidas no solo é através da utilização de plantas indicadoras em bioensaios. Os sintomas de fitotoxicidade produzidos nas folhas de várias dicotiledôneas por herbicidas auxínicos são facilmente caracterizados e por isso são muito utilizadas para detectar resíduos desses herbicidas no solo (THILL, 2003). Uma das espécies mais utilizadas nesses bioensaios é o pepino (*Cucumis sativus*) (SANTOS et al. 2006).

A avaliação da toxicidade potencial de substâncias no ambiente aquático é determinada por testes ecotoxicológicos que utilizam organismos bioindicadores (AZEVEDO; CHASIN, 2003), os mais utilizados são algas unicelulares, espécies de microcrustáceos, peixes e macrófitas aquáticas (MANN; BIDWELL, 1999).

Os organismos bioindicadores, na presença dos agrotóxicos respondem a eles por meio de reações comportamentais mensuráveis, fornecendo a probabilidade de causarem efeitos adversos no meio ambiente caracterizando assim, o grau de perigo e determinando os possíveis riscos de intoxicação ambiental do ecossistema aquático (ANDRÉA, 2008).

O triclopyr na formulação Garlon 480 BR está na forma de éster butoxiétílico (TBEE) é um herbicida sistêmico seletivo, utilizado em pastagem e na cultura do arroz, no controle de plantas daninhas herbáceas e lenhosas. No solo o triclopyr não faz ligações químicas estáveis o que aumenta o seu potencial de se mover e atingir os lençóis freáticos e na água o éster se liga nas partículas orgânicas da coluna de água é precipitado para as camadas de sedimento (MCCALL; GAVIT, 1986).

Devido à necessidade do uso racional dos herbicidas para minimizar os impactos ambientais da agricultura e das possíveis utilizações não agrícolas destes produtos químicos, o objetivo deste trabalho foi de avaliar os possíveis impactos e em que níveis os resíduos do triclopyr podem promover riscos de intoxicação para organismos aquáticos e terrestres, selecionar plantas testes e organismos bioindicadores que possam ser utilizadas no monitoramento ambiental desta molécula e se sua eficácia no controle de macrófitas ocorre em concentrações seguras para manter o equilíbrio do ambiente aquático.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ecotoxicologia dos herbicidas

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut (TRUHAUT, 1977). Segundo este autor, a ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (PLAA, 1982; CAIRNS; NIEDERLEHNER, 1995; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A Ecotoxicologia também foi definida por Ramada (1977) como a ciências que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera. Torna-se claro que a ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos dos poluentes aos organismos e como interagem com seus habitat (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os herbicidas são classificados como micropoluentes para os ecossistemas e a adulteração provocada por eles em solos, suprimentos aquíferos e alimentícios têm sido objeto de constantes estudos e discussões (LUCHINI; ANDRÉA, 2000). Os impactos ambientais causados pelo uso dos agrotóxicos podem ocorrer porque esses compostos podem permanecer por mais tempo do que o necessário para exercer sua ação, afetando o ecossistema como um todo (LUCHINI; ANDRÉA, 2000).

O uso descontrolado, a propaganda massiva, o medo de perda da produtividade da safra, a cultura “fruto bonito é aquele que as pessoas gostam de comprar” (SILVA; FAY, 2004), entretanto o uso desordenado pode gerar resíduos que irão atingir os mananciais de água e o solo.

O resíduo de agrotóxicos uma vez no solo pode sofrer diversas interações e movimentação como lixiviação, percolação adsorção e tudo isto depende das características do ambiente e das características físico-químicas do ingrediente ativo utilizado (Figura 1).

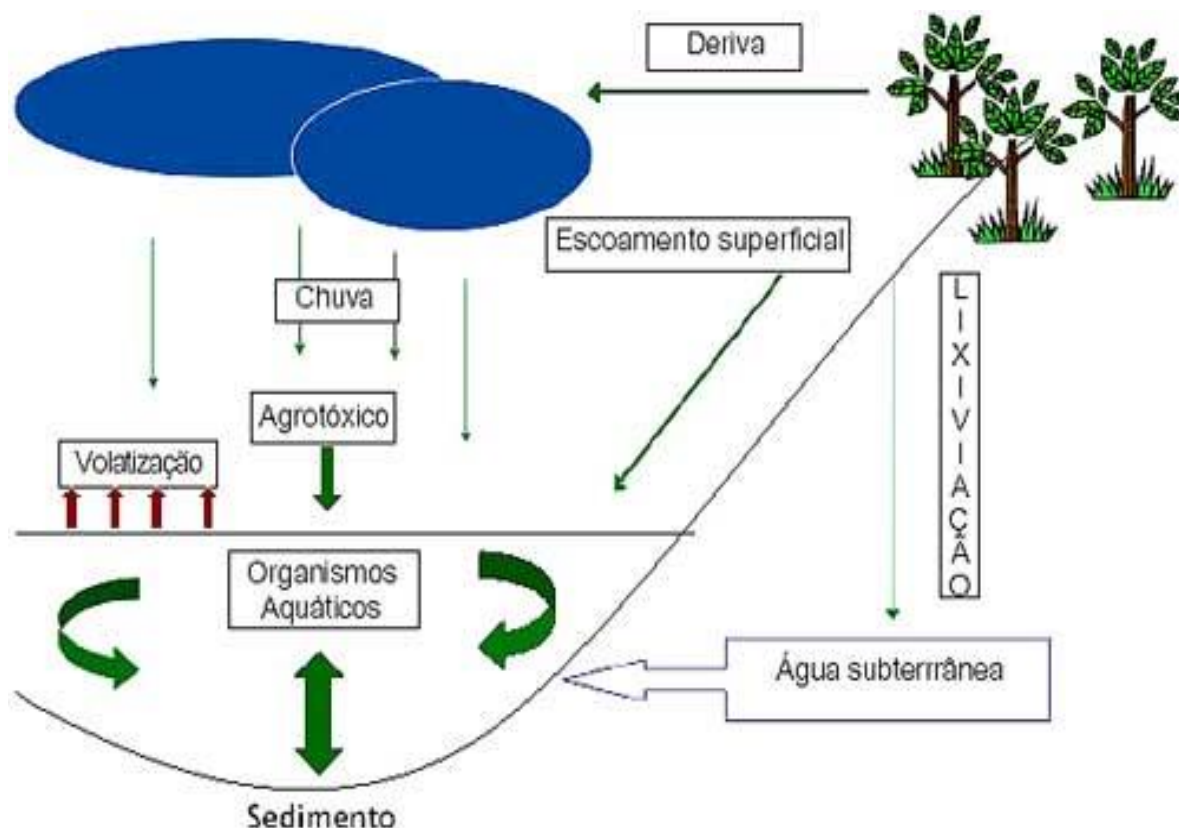


Figura 1. Caminho percorrido pelos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos (adaptado de NIMMO, 1985; SILVA; SANTOS, 2007).

Os herbicidas são potencialmente danosos para todos os organismos vivos, toda via sua toxicidade e comportamento no meio ambiente variam muito. Esses efeitos podem ser crônicos quando interferem na expectativa de vida, crescimento, fisiologia, comportamento e reprodução dos organismos; e/ou ecológicos quando interferem na disponibilidade de alimentos, de habitat e na biodiversidade (LUNA et al., 2004), e tem a interferência dos herbicidas sobre a dinâmica dos ecossistemas, como nos processos de quebra da matéria orgânica e de respiração do solo, ciclo de nutrientes e eutrofização de águas. Pouco se conhece, entretanto sobre o comportamento final e os processos de degradação desses produtos no meio ambiente (LUNA et al., 2004).

A maior parte dos herbicidas utilizados acaba atingindo o solo e as águas, principalmente pela deriva na aplicação, controle de plantas daninhas, lavagem das folhas tratadas, lixiviação, erosão, aplicação direta em águas, resíduos de embalagens vazias, lavagens de equipamentos de aplicação e efluentes de indústrias de agrotóxicos (LUNA et al., 2004).

Devido aos impactos causados pelos agrotóxicos estabelece o Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) para todos os produtos técnicos e formulações existentes no mercado, que é determinado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), (STUTZER; GUIMARÃES, 2003).

2.2. Ensaios ecotoxicológicos

O estudo dos efeitos de substâncias químicas tóxicas nas comunidades naturais é um dos objetivos fundamentais da ecotoxicologia (ANDRÉA, 2008). Entretanto, há pelo menos uma década tem-se notado que alguns organismos - peixes, insetos, algas, plantas, são resistentes a alguns níveis de contaminação, não morrem quando expostos a agentes tóxicos e fornecem informações precisas sobre a saúde dos ambientes respectivos de cada um desses organismos. Esses tipos de plantas e animais são chamados de indicadores biológicos ou bioindicadores da presença de contaminantes no ambiente (ANDRÉA, 2008).

Na década de 80, as agências ambientais no mundo todo, começaram a desenvolver protocolos padronizados de teste de toxicidade utilizando organismos aquáticos (USEPA 1996; OECD, 2002). Em 1984, a USEPA estabeleceu o uso de organismos para fins de monitoramento ambiental da qualidade da água, chamado de Biomonitoramento (USEPA, 1986). Ao mesmo tempo, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), na Europa, lançava uma série de protocolos de teste com organismos aquáticos como algas, microcústeos e peixes (OECD, 2002).

Os organismos bioindicadores, apesar de não morrerem por alterações do ambiente, respondem a elas por meio de reações comportamentais ou metabólicas mensuráveis, que indicam e refletem alguma mudança no ambiente onde eles vivem (ANDRÉA, 2008).

Os organismos-teste utilizados no Brasil são comumente espécies exóticas, determinadas em normas internacionais aprovadas no país. Entretanto, a realização de estudos ecotoxicológicos com espécies locais ou autóctones representativas de nossos ecossistemas é extremamente relevante (CAIRNS; NIEDERLEHNER 1995). Estes estudos são relevantes principalmente para realizar o monitoramento das contaminações das redes hidrográficas presentes nas áreas agrícolas (IGNÁCIO, 2014).

Os critérios de seleção de organismos-teste normalmente são: abundância e disponibilidade; significativa representação ecológica dentro das biocenoses; cosmopolitismo da espécie; profundo conhecimento da biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade de suas populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; importância comercial; facilidade de cultivo em laboratório e, se possível, a espécie deve ser nativa para a melhor representatividade dos ecossistemas (RAND; PETROCELLI, 1985).

Para que os efeitos dos resíduos de agrotóxicos sejam identificados, recomenda-se a utilização de pelo menos três espécies que representem os diferentes níveis das cadeias tróficas, com intuito de se obter resultados mais precisos do efeito tóxico especificam e aumentar a probabilidade de respostas tóxicas a organismos de diferentes sensibilidades (BAUN et al. 1999; IGNÁCIO, 2014).

Os peixes são os animais mais utilizados como bioindicadores em ensaio ecotoxicológicos (HERRICKS, 2002). Os peixes são ótimos organismos-teste para o monitoramento de ambientes aquáticos, devido às diferentes respostas às contaminações; como mudanças na taxa de crescimento e na maturação sexual (IGNÁCIO, 2014).

Espécies de peixes ornamentais e nativas também podem ser utilizadas, como o peixe popularmente denominado de mato-grosso (*Hypessobrycon eques*), é um peixe neotropical da Ordem Characiformes e vivem em rios e lagos, e se alimentam basicamente de algas e plantas (IGNÁCIO, 2014).

O caramujo (*Pomacea canaliculata*) é um molusco nativo das regiões tropicais da América do Sul, esses moluscos habitam ampla gama de ecossistemas, desde pântanos e lagoas até lagos e rios (MARTIN et al., 2002). De acordo com estas

características e os critérios de seleção de organismos-testes, esta espécie destaca-se com grande potencial para ser utilizada como um relevante bioindicador em ensaios ecotoxicológicos (IGNÁCIO, 2014).

As espécies *Daphnia magna* são os cladóceros mais utilizadas como organismos-teste em ensaios de ecotoxicologia aquática (MITCHELL et al., 2004).

A *Daphnia magna* é um organismo filtrador utilizado em ensaios ecotoxicológicos devido as seguintes características favoráveis: ciclo de vida curto com elevada taxa reprodutiva, sobrevivência em pequenos espaços, facilidade de adaptação às condições de laboratório e manejo, e alta sensibilidade a grande variedade de produtos químicos (ARAUCO et al., 2005).

A macrófita aquática *Lemna minor*, conhecida pelo nome vulgar de lentilha d'água, é uma angiosperma, do grupo da monocotiledônea muito utilizada em ensaios ecotoxicológicos é ainda pequena se comparada aos demais organismos. No entanto, essas espécies são indicadas por grandes organizações (EPA e OECD, 2002) como potencial organismo bioindicador pela sua importante função ecológica e serem os primeiros organismos atingidos por poluentes lançados nos ecossistemas aquáticos (IGNÁCIO, 2014).

A macrófita *Lemna minor* tem diversas características favoráveis para ser utilizada em testes ecotoxicológicos, como: pequeno tamanho, estrutura simples e rápido crescimento e propagação vegetativa (CASSIDY, 2010), da mesma forma a espécie *Azolla caroliniana* tem potencial como organismo bioindicador, pois também é uma planta aquática flutuante, de fácil manejo, ciclo de vida curto, pequeno porte e cosmopolita (LUMPKIN; PLUCKNEET, 1980).

Diversos estudos já foram realizados em ambientes aquáticos para avaliar a toxicidade de agroquímicos, destacando-se o trabalho de Helfrich et al. (1996) que utilizaram a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) para estimar a toxicidade do herbicida oxyfluorfen (Goal BR) e do inseticida carbofurano (Furadan). Frello (1998) utilizou *Daphnia magna* e *Poecilia reticulata* para avaliar a toxicidade do carbofurano. Jonsson e Maia (1998) estimaram a CL50; 96h para o peixe *Hypessobrycon scholzei* para diversos herbicidas.

2.3. Triclopyr

O ingrediente ativo (i.a) triclopyr foi registrado como TEA em 1979 e como TBEE em 1980, ambos os produtos químicos são utilizados no controle de plantas daninhas (USEPA, 1996). O triclopyr é um herbicida seletivo de ação sistêmica, normalmente caracterizada pelo seu efeito crônico (GIANCOTTI et al., 2010) é composto de cloropyridina usado no controle de plantas daninhas herbáceas e lenhosas de folhas largas, florestas, parques e pastagens, não apresentam danos às gramíneas (TU et al., 2001; USEPA, 1998).

O triclopyr é um herbicida mimetizador das auxinas (ácido endol acético) que é um hormônio de crescimento produzido pelas plantas (TRU et al., 2001). Estes herbicidas agem da mesma forma que as auxinas naturais nas plantas, porém como são aplicados em doses maiores que os reguladores de crescimento, apresentam ação herbicida nas plantas daninhas da classe das dicotiledôneas (CHRISTOFFOLETI et al., 2001).

O mecanismo de ação dos herbicidas mimetizadores das auxinas não está completamente conhecida, mais se acredita que a acidificação das paredes celulares permite que as células se expandam de forma desordenada devido à produção excessiva da auxina sintética. Eles interferem na diferenciação celular, inibindo ou estimulando de forma errática o desenvolvimento nas áreas meristemáticas e provocando uma diferenciação em tecidos com células já estabilizadas (KISSMANN, 2003, USEPA, 1998).

Em baixas concentrações o triclopyr estimula a produção de RNA, DNA e a síntese de proteínas o que leva a uma divisão celular descontrolada, provocando um crescimento desordenado e por fim a destruição do tecido vascular. Inversamente em concentrações elevadas pode inibir a divisão celular e o crescimento (TU et al., 2001).

O triclopyr é vendido na forma de sal de trietilamina sal (TEA) ou éster butoxiétílico (TBEE) que são derivados do ácido triclopyr (USEPA, 1998). No solo natural e em ambiente aquático o TBEE e o TEA são convertidos rapidamente para o ácido triclopyr que é neutralizado até um sal relativamente não tóxico. É o ácido

triclopyr (conhecido simplesmente como triclopyr), que causa a intoxicação nas plantas alvos (LEWER; OWEN, 1990).

No Brasil o triclopyr é muito utilizado para o controle de plantas daninhas em pastagens, sendo o Garlon 480BR o herbicida mais vendido e sua formulação é o triclopyr éster. O triclopyr na formulação éster apresenta degradação rápida no solo, com meia vida de 20 a 45 dias, variando com o tipo de solo e com o clima a sua degradação ocorre mais rápido em condições de umidade e temperatura mais elevada. Em solos com pH baixo o seu grau de adsorção é mais elevado e a mobilidade é menor (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998). Na água o éster não é solúvel podendo apresentar mais tempo para se degradar e pode se ligar a fração orgânica da coluna d' água podendo assim ser transportado para os sedimentos (McCALL; GAVIT, 1986). As moléculas de ésteres ligadas irá se degradar por hidrólise ou fotólise em triclopyr ácido (SMITH, 1976).

A meia-vida do triclopyr em solos pode variar de 3,7 a 314 dias, mas as médias são de 30 dias, dependendo da formulação aplicada, do tipo de solo e das condições ambientais. Se as condições do solo são quentes e úmidos, o metabolismo microbiano pode ser o principal meio de degradação (NEWTON et al., 1990).

Em ensaios realizados em laboratório relatou-se uma meia vida do ácido triclopyr em quatro solos num período de 138 dias, mas desta vez a meia vida variou com a temperatura do solo. A 15 ° C a meia-vida variou de 64-314 dias, enquanto que a 30 ° C a meia-vida foi de 9-135 dias (JOHNSON et al., 1995).

No Sudoeste Oregon, encontraram 24-51% de resíduos de triclopyr no solo seco com clima frio após 37 dias. Após um aumento da temperatura e da umidade, a dissipação aumento e os resíduos de triclopyr exibiram uma meia-vida de 11-25 dias (NEWTON et al., 1990).

O triclopyr não faz ligações químicas estáveis com o solo e tem potencial para se mover no solo, onde sua meia-vida pode variar de 30-90 dias. O TBEE apresenta baixa solubilidade em água e degrada-se em ácido triclopyr em três horas (EXTONET, 2002).

A capacidade de adsorção do ácido triclopyr no solo é intermediária. Assim, o movimento de pequenas quantidades de resíduos de triclopyr após as primeiras

chuvas é significativo (MCCALL; GAVIT, 1986), mas acredita-se que a lixiviação seja menor (NEWTON et al., 1990).

O movimento do triclopyr na superfície e o escoamento subsuperficial em áreas com baixa precipitação acredita-se ser negligenciável (NEWTON et al., 1990; STEPHENSON et al. 1990). Segundo Norris et al. (1987), a lixiviação e o fluxo superficial de água contribuíram para que a quantidade do herbicida fosse significativa, concluíram que o triclopyr apresentava pouco risco para organismos não alvo ou para os usuários de água desta área.

Segundo Newton et al. (1990), o triclopyr não estaria presente nos animais, na forragem em doses suficiente para causar os efeitos da toxicidade aguda ou crônica e concluiu que como o triclopyr se dissipa rapidamente no ambiente não teria problemas com bioacumulação na cadeia alimentar.

Em espécies aquáticas a formulação éster é altamente tóxica para peixes e invertebrados aquáticos com uma CL50 (96horas) de 0,74 mg/L em truta arco-íris e 0,87 mg/L em *bluegill sunfish* (WSSA, 1994; USEPA, 1998). A natureza hidrofóbica do éster permite que ele seja facilmente absorvido através dos tecidos de peixes, onde é rapidamente convertido em ácido triclopyr. O ácido pode se acumular em níveis tóxicos quando os peixes são expostos a concentrações suficientes e por duração suficiente. A extensão de que os efeitos tóxicos do éster são reduzidos por degradação é mal explicado ou entendido. Estudos tem demonstrado que a formulação éster degrada rapidamente às formas menos tóxicas (THOMPSON et al., 1991). Estudos tem demonstrado que existem efeitos agudos letais para peixes quando expostos a resíduos de baixo nível por mais de seis horas (KREUTZWEISER et al., 1994).

2.4. Eficácia do triclopyr em macrófitas

Uma grande diversidade de macrófitas aquáticas pode ser encontrada vegetando as margens de rios e reservatórios ou dentro dos mais diversos ambientes aquáticos, empregando diferentes mecanismos de adaptação para sobrevivência e desenvolvimento (MARTINS et al., 2002). As macrófitas aquáticas desempenham um papel extremamente importante no funcionamento dos

ecossistemas onde ocorrem, estabelecendo forte ligação entre o sistema aquático e o ambiente terrestre circundante (ESTEVEZ, 1998).

No entanto, o rápido crescimento populacional de várias espécies de macrófitas favorece a colonização de vastas áreas, podendo afetar os usos múltiplos do ecossistema aquático. Assim, a despeito de sua importância ecológica, o termo “daninha” tem sido empregado com relativa frequência na literatura (THOMAZ, 2002).

A proliferação das plantas aquáticas constitui-se hoje em um sério e complexo problema de repercussão não apenas em nível ambiental, pois atinge igualmente as áreas econômicas e sociais (MARCONDES; TANAKA, 1997). Nessas condições, o controle dessas plantas daninhas aquáticas torna-se fundamental para manutenção da função social, econômica e ambiental do corpo hídrico (PITELLI et al., 2008).

Entre as opções de manejo dessas plantas, o controle químico tem sido empregado em vários países, pois promove resultado rápido e eficiente (CARDOSO et al., 2003; MUSTAFÁ et al., 2010). Entretanto, o método de controle químico é o menos aceito pela sociedade, por utilizar substâncias cuja toxicidade a diferentes espécies e ao próprio homem nem sempre é inteiramente conhecida, ainda que o uso de herbicidas específicos para ambientes aquáticos seja permitido mesmo em países desenvolvidos como nos Estados Unidos sua aplicação é motivo de controvérsia em vários países europeus. Assim, a utilização de substâncias com o maior grau de especificidade possível, ou seja, que atinjam somente a espécie alvo constitui-se em grande desafio para a aplicação de métodos químicos (THOMAZ, 2002).

Para que um herbicida possa ser utilizado diretamente no ambiente aquático uma série de medidas deve ser precedida que incluem testes de toxicidade, envolvendo organismos nativos da região onde os herbicidas vão ser aplicados e acompanhados pelo monitoramento dos possíveis impactos no ecossistema (THOMAZ, 2002).

No Brasil há apenas um herbicida registrado para o controle de plantas daninhas aquáticas; trata-se do fluridone, que é específico para macrófitas submersas (PITELLI et al., 2008). Em muitos países, como Estados Unidos, Canadá e Nova Zelândia, as plantas aquáticas vêm sendo estudadas há muitos anos, e

diferentes métodos de controle, mecânicos, biológicos e químicos, são adotados. Dentro do controle químico, uma grande quantidade de herbicidas já foi testada, isoladamente ou de maneira associada a outras práticas, sendo selecionados aqueles em que o controle não acarreta prejuízos ao habitat natural dessas plantas ou mesmo a peixes e outros organismos aquáticos (MARCHI et al., 2009).

Segundo o departamento de Gestão em Ecologia do Estado de Washington, os herbicidas aprovados para uso aquático pelos Estados Unidos Environmental Protection Agency (EPA) foram revistos e são considerados compatíveis com o ambiente aquático, quando utilizado de acordo com as instruções do rótulo. Os produtos químicos que são permitidos para o uso a partir de 2006 no ambiente aquáticos segundo a EPA são o glifosato, fluridone, 2,4-D, Endotal, triclopyr- TEA e Imazapyr.

O herbicida triclopyr existe em duas formulações, a formulação triclopyr TEA que está registrado para ser utilizados em ambientes aquáticos. O triclopyr na formulação TBEE pode ser eficaz no controle de macrófitas aquática sem que o dose necessária passa da recomendação técnica o que poderia atingir organismos não alvo o que provocaria o desequilíbrio e até mesmo a contaminação do ambiente aquático. O Triclopyr é tipicamente aplicado no campo a taxas de 0,75 a 2,5 mg L⁻¹ para o controle da Eurásia watermilfoil (RenovarTM 3 rótulo) (POOVEY et al., 2007).

2.5. Plantas indicadoras de resíduos do triclopyr no solo

Os herbicidas são compostos químicos que têm alta persistência no solo possuem maior potencial de contaminação do ambiente (MELO et al., 2010) e dependendo da cultura sucessora podem causar fitotoxicidade. A permanência de um herbicida no solo depende do Ph, matéria orgânica, textura, umidade do solo (LOUX; REESE, 1993), mineralogia, retenção de água e da atividade microbiana do solo (WITT; FLINT, 1997).

A determinação de um herbicida no solo pode ser feita pelo uso de plantas indicadoras em bioensaios. A utilização das plantas indicadoras apresenta como principal vantagem detectar somente resíduos biologicamente ativos no solo, não

havendo necessidade de instrumentos onerosos e de prévia extração dos resíduos do solo (BEYER et al., 1988).

Para efeitos conceituais, planta indicadora da presença de herbicida é aquela que apresenta qualquer nível de sensibilidade. As características das espécies indicadoras mais importantes são: alta taxa de crescimento, pois permitirá rápida visualização dos sintomas ocorridos; ampla distribuição geográfica para que as espécies possam ser utilizadas como indicadoras em outros locais de estudo; e homogeneidade genética, pois padroniza as respostas obtidas e possibilita maior homoscedasticidade da variância na análise dos dados (NUNES; VIDAL, 2009).

Nos bioensaios as plantas que serão utilizadas como indicadoras devem apresentar fácil cultivo, rápido desenvolvimento e alta sensibilidade aos herbicidas avaliados (NYFFELER et al., 1982; SOUZA, 1999). Os sintomas de intoxicação produzidos nas folhas de várias magnoliopsida ou dicotiledôneas por herbicidas auxínicos são facilmente caracterizados e por isso são muito utilizadas para detectar resíduos desses herbicidas no solo (THILL, 2003). Uma das espécies mais utilizadas nesses bioensaios é o pepino (*Cucumis sativus*) (SANTOS, et al. 2006).

Os herbicidas auxínicos causam, em espécies sensíveis, intensa divisão celular no câmbio vascular, endoderme, periciclo e floema, com consequente formação de tumores no meristema intercalar, aparecimento de raízes aéreas, multiplicação e engrossamento de raízes e caule. Há formação de gemas múltiplas e hipertrofia das raízes laterais, sendo o encurtamento do tecido internerval e a epinastia os sintomas mais evidentes em dicotiledôneas (SILVA; SANTOS, 2007).

A persistência do triclopyr no solo depende do tipo de solo e das condições climáticas, podendo apresentar meia-vida no solo de 20-45 dias. Resíduos de triclopyr foram observados somente em amostras de solo coletadas aos 10 DAA, não tendo sido observada intoxicação na planta de pepino nos tratamento com o triclopyr a partir de 40 DAA (SANTOS et al., 2006).

Num estudo realizado com pepino, soja, milho e feijão, o pepino foi o que apresentou maior sensibilidade aos herbicidas trifloxysulfuron-sodium e pyriithiobac-sodium. As plantas de pepinos não se desenvolveram e permaneceram até o momento da coleta (21 DAA) somente com suas folhas cotiledonares, enquanto a

testemunha já possuía três folhas verdadeiras, o que comprova a utilização do pepino como planta indicadora de herbicidas. (GUERRA et al., 2011).

A permanência do herbicida no solo, após a sua aplicação, pode determinar a eficácia no controle de plantas daninhas, sendo denominada período residual. Contrariamente, pode determinar problemas, tais como: danos à cultura subsequente e o risco de contaminação ambiental, sendo, então, denominada persistência (ROSS; LEMBI, 1999).

Os resultados apresentados em bioensaios são semiquantitativos e necessitam curvas de calibração para cada herbicida e para cada espécie indicadora (BEYER et al., 1988).

3. MATERIAL E METÓDOS

3.1. Determinação da toxicidade aguda em organismos bioindicadores

Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Estudo e Pesquisas Ambientais em Matologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP Jaboticabal (NEPEAM) e no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional do Departamento de Fitossanidade. O ingrediente ativo estudado foi o triclopyr na formulação Garlon 480 BR (667 g de ácido triclopyr) fornecido pela Dow AgroScience.

3.1.1. Manutenção e aclimação dos organismos bioindicadores

As *Daphnias magnas* foram mantidas em cristalizadores em sala de bioensaio, com água de cultivo e alimentadas uma vez ao dia. Diariamente os neonatos de um dia de idade (estágio jovem) foram retirados e utilizados nos testes.

As macrófitas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana* foram mantidas em recipiente de plástico, com uma camada de solo no fundo e água em estufa coberta com sombrite 70. Em seguida as macrófitas foram transferidas para cristalizadores onde foi adicionado 1 l do meio de cultivo “Hoagland’s” e 1 l de água destilada, onde ficaram aclimatadas em sala de bioensaio, com temperatura de 25 °C e iluminação constante, durante três dias (OECD, 2002).

O *Hypessobrycon eques* e a *Pomacea canaliculata*, foram mantidos em caixas com capacidade de 500L, em ambiente aberto e sombreado. Em seguidas foram transferidos para uma sala climatizada (temperatura entre 25 e 27 °C) e fotoperíodo de 12 horas, onde ficaram por sete dias, após foram realizados todos os testes. Os *H. eques* foram alimentados com ração comercial e as *P. canaliculatas* com a macrófita *Hydrilla verticillata*, uma vez ai dia segunda as normas NBR 15088 da ABNT (2004).

3.1.2. Testes preliminares e de sensibilidade

Antes da realização dos testes definitivos de toxicidade aguda, foram realizados os testes para avaliar a sensibilidade dos organismos bioindicadores. Nestes testes foram utilizadas substâncias de referências como cloreto de sódio (Na Cl) para *D. magna*, *L. minor* e *A. caroliniana* (OECD, 2002) e o cloreto de potássio (KCl) para *H. eques* e *P. canaliculata*, com o intuito de verificar a sensibilidade dos organismos.

Para a *D. magna*, *L. minor* e *A. caroliniana* as concentrações efetivas (CE; 48h/7d) estimadas do cloreto de sódio foram de 4,50; 4,70 e 5,9 mg L⁻¹, respectivamente. Para o *H. eques* e *P. canaliculata* as concentrações letais e/ou efetivas (CE e/ou CL 48h) estimadas para o cloreto de potássio (KCL) foram de 1,72 e 1,75 mg L⁻¹, respectivamente.

Em seguida foram realizados testes preliminares para determinar o intervalo de concentrações que o triclopyr causasse de 0 a 100% de mortalidade em *H. eques*, imobilidade ou mortalidade em *P. canaliculata* e para *D. magna* e necrose e/ou clorose em *L. minor* e *A. caroliniana*.

3.1.3. Testes de toxicidade aguda para *Daphnia magna*

Os testes definitivos foram realizados em sala de bioensaio climatizada com temperatura 20 ± 2 °C e ambiente escuro. As unidades experimentais foram compostas por fracos de vidros com capacidade para 25 ml. Nestes fracos foram colocados 20 ml das soluções diluídas com o triclopyr, em seguida foram transferidas cinco neonatas para cada frasco com um auxílio de uma pipeta automática (ABNT, 2009). Os tubos de ensaio permaneceram cobertos com pano preto para impedir a incidência da luz interna da estufa incubadora BOD (ABNT, 2009).

As concentrações definitivas de triclopyr foram: 0,05; 0,1; 0,5; 0,9; 1,30 e 1,70 mg L⁻¹ mais a testemunha, com três repetições que foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Os animais que estiveram imóveis e não forem capazes de nadar durante 15 segundos, após 48 horas foram retirados e considerados mortos (ABNT, 2009). O valor da CE50; 48h foi estimado pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977).

3.1.4. Teste de toxicidade aguda para *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*

Os testes definitivos foram montados após três dias de aclimação, onde foram selecionadas cinco plantas de *Azolla* e três plantas de *Lemna* com três frondes cada e foram desinfetadas em solução aquosa de hipoclorito de sódio 3% e colocadas em recipientes de vidro contendo 50 ml do meio de cultivo “Hoagland’s” por 24 horas. Após este período, foram adicionados mais 50 ml de “Hoagland’s” com as concentrações desejadas do triclopyr.

As concentrações definitivas de triclopyr utilizadas foram: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 mg L⁻¹ mais a testemunha, com três repetições.

A avaliação da porcentagem de clorose e/ou mortalidade das plantas foram realizada em três, cinco e sete dias após a exposição ao triclopyr. Para *Azolla*, a avaliação foi feita utilizando à escala de notas (A E) de acordo com Velini et al. (1995), as notas foram transformadas em porcentagem de inibição de crescimento onde cada planta correspondeu a 20 %, sendo A de 91 a 100%; B de 81 a 90%; C de 71 a 80; D de 41 a 70% e E 0 a 40%. Para *Lemna* foram avaliados o número de frondes e o número de plantas de cada recipiente que apresentaram mudanças nas suas funções vitais (crescimento, reprodução e morte) durante a exposição ao triclopyr.

Os resultados da toxicidade aguda CE50; 7 dias, foi calculada pelo método de Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977).

3.1.5 Testes de toxicidade aguda para *P. canaliculata* e *H. eques*

Os testes definitivos foram realizados em sala de bioensaio, os *H. eques* e as *P. canaliculata* com pesos variando entre 1,5 a 2,5 g e 4,5 e 5,5 g respectivamente, foram pesados e colocados nas unidades experimentais.

Nos testes com *H. eques* foram utilizados três peixes por réplica e nos testes com a *P. canaliculata* utilizou-se cinco indivíduos por réplica, ambos com três repetições e respeitando a densidade máxima de 1 g L⁻¹ num sistema estático (ABNT, 2004).

As concentrações definitivas de triclopyr utilizadas foram: 0,1; 0,5; 0,75; 1,0 e 2,5 mg L⁻¹ para *H. eques* e 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L⁻¹ para a *P. canaliculata*, todos com uma testemunha.

As unidades experimentais foram compostas por aquários, onde foram colocados 2 litros de água e em seguidas os organismos foram pesados e colocados nas unidades experimentais. Após 24 horas o triclopyr foi aplicado completando o volume para 3 litros de água.

Os sinais de intoxicação para o *H. eques* (agitação, posição na coluna d' água, batimento opercular, natação errática e capacidade de arfagem) e a avaliação da mobilidade da *P. canaliculata* foram monitorados em 24 e 48 horas após a exposição do produto. Os valores da CL50; 48 horas para *H. eques* e a CE50; 48 horas para *P. canaliculata* foram calculados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977).

3.2. Classificação da toxicidade aguda para o triclopyr

O triclopyr foi classificado quanto ao seu potencial tóxico no meio ambiente aquático de acordo com as classes de toxicidade aguda proposta por Zucker (1985) (Tabela 1) para todos os organismos bioindicadores e segundo Helfrich et al. (1996), para o *H. eques* (Tabela 2).

Tabela 1. Classificação da Toxicidade aguda para organismos aquáticos (ZUCKER, 1985).

Classificação da toxicidade	CL50 ou CE50 (mg L⁻¹)
Extremamente tóxico	<0,1
Altamente tóxico	0,1 a 1,0
Moderadamente tóxico	>1,0 a <10
Ligeiramente tóxico	>10 a <100
Praticamente não tóxico	>100

Tabela 2. Classificação da Toxicidade aguda para peixes dos herbicidas (HELFRICH et al., 1996).

Classificação da Toxicidade	CL50 (mg L⁻¹)
Super. tóxico	<0,01
Extremamente tóxico	0,01 – 0,10
Altamente tóxico	0,11 – 1,0
Moderadamente tóxico	1,1 - 10
Ligeiramente tóxico	10 - 100
Não tóxico	>100

3.3. Classificação do risco de intoxicação ambiental para triclopyr

Há vários modelos para estudo do risco de intoxicação ambiental para um xenobionte. A classificação de Goktepe et al. (2004) é mais rígida, pois é uma classificação ecológica enquanto que a da USEPA (1987) e de Urban e Cook (1986) são classificações técnicas utilizadas principalmente na regulamentação de produtos por empresas (IGNÁCIO, 2014).

A determinação do risco de intoxicação ambiental foi realizada a partir de dados da toxicidade aguda para todos os organismos bioindicadores e das concentrações ambientais estimadas (CAE) para o triclopyr, cujas relações quantitativas são utilizadas para classificar os riscos ambientais das substâncias tóxicas específicas (URBAN; COOK, 1986; KOKTA; ROTHERT, 1992; SOLOMON, 1996; USEPA, 1996, IGNÁCIO, 2014).

Para o cálculo das CAE, foi considerada uma diluição homogênea de contaminações das águas, que partiu da maior dose recomendada do herbicida Garlon 480 BR (2 l ha⁻¹) (ANDREI, 1999; IGNÁCIO, 2014).

As contaminações consideradas das águas foram: 100% (2000 ml), 50% (1000 ml), 25% (500 ml), 12,5% (250 ml), 6,25% (125 ml), 3,12% (62,5 ml) e 1,56% (31,25g) diluídas uniformemente no espelho de água de um reservatório de um hectare (10.000 m²) de área e com 0,3 m de profundidade (BOOCK; MACHADO-NETO, 2000; IGNÁCIO, 2014) e 2,0 m de profundidade (SOLOMON, 1996; IGNÁCIO, 2014).

Os quocientes (Q) de risco foram calculados pela divisão da concentração ambiental estimada (CAE) pela CL50 ou CE50 calculadas nos ensaios de toxicidade aguda com cada espécie (USEPA – SW 846 (1987); GOKTEPE et al., 2004; URBAN; COOK, 1986) (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação do risco ambiental para compostos tóxicos de acordo com os valores calculados do quociente Q

Referência	Q	Classes
USEPA (1987)	<0,1	Sem risco
	0,1 – 1,0	Risco baixo
	1,0 – 10,0	Risco moderado
	>10,0	Risco Alto
Goktepe et al. (2004)	<0,05	Baixo risco
	0,05 -0,5	Médio risco
	>0,5	Alto risco
Urban e Cook (1986)	<0,1	Risco com nenhum efeito adverso
	0,1 - 10	Risco com possibilidade de efeito adverso
	>10	Risco com probabilidade de efeito adverso

3.4. Eficácia do triclopyr no controle de plantas aquáticas

Para a realização dos testes de eficácia com *Myriophyllum aquaticum*, *Nymphaeaceae indica* e *Limnobium laevigatum*, três mudas com aproximadamente 10 cm foram colocadas para multiplicação em caixas com capacidade para 5 l, que foram preenchidas com substrato contendo areia e terra sem resíduos de agrotóxicos (1:3) e foram mantidas em casa de vegetação. O teor de água nas caixas foi repostado a cada dia ou quando o nível de água ficava baixo. As caixas foram adubadas com a formulação comercial 04-14-08, dois dias após o plantio das mudas.

O triclopyr foi aplicado quando as plantas já ocupavam o volume das caixas que foi de aproximadamente 45 dias após o plantio das mudas. As concentrações de triclopyr utilizadas foram 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 L ha⁻¹. Os tratamentos foram distribuídos de forma continua contendo 10 repetições.

A aplicação foi realizada com um pulverizador costal com pressão constante de 25 p.s.i. mantida por CO₂ (bico de pulverização tipo 110 02XR VK e consumo de calda de 200 L ha⁻¹). A aplicação do herbicida foi realizada no período da manhã, onde as condições climáticas se encontravam mais adequadas, com umidade relativa de 60%, ausência de vento, temperatura em torno de 28 - 30 C° e com sol.

A avaliação da sensibilidade das macrófitas ao triclopyr foi realizada no 3°, 7°, 15°, 21°, 30°, 45° e 60° dias após a aplicação (DAA) de forma visual numa escala de 0 - 100% de inibição do crescimento das macrófitas em relação à testemunha e determinando assim a porcentagem de controle (ALAM, 1974) (Tabela 4). No 60° dia após a aplicação foi avaliado o acúmulo de biomassa, inibição de crescimento, capacidade de rebrota e estimou-se a curva de dose-resposta para as três espécies utilizadas neste trabalho.

Tabela 4. Conceito aplicado a avaliações de controle de plantas por herbicidas (ALAM, 1974).

0 – 40%	Nenhum
41- 60%	Controle considerado regular
61- 70%	Controle considerado suficiente
71- 80%	Controle considerado bom
81 – 90%	Controle considerado muito bom
91 – 100%	Controle considerado excelente

3.5. Plantas indicadoras de resíduos do triclopyr no solo

As culturas utilizadas como bioindicadores do herbicida triclopyr no solo foram pepino (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e rabanete (*Raphanus sativus*).

Os ensaios de fitotoxicidade foram realizados em sala aclimatada com temperatura de 25 C° e fotoperíodo de 12 horas, as unidades experimentais utilizadas foram recipientes de plásticos perfurados, onde foram colocados 300 g de areia, com o objetivo de ver somente a resposta do herbicida nas plantas indicadoras.

As culturas foram semeadas em células e quando saíram às primeiras folhas verdadeiras foi realizado o transplante de três mudas para cada unidade experimental. O delineamento experimento adotado foi o DIC (Delineamento inteiramente casualizado), que foi constituído por cinco tratamentos e mais a testemunha, com cinco repetições.

As concentrações do herbicida triclopyr utilizadas foram 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; e 7,5 mg L⁻¹ e mais a testemunha. As soluções correspondentes a cada concentração foram preparadas através da diluição do produto comercial em água destilada (calda do herbicida) e a contaminação da areia pelo triclopyr foi realizada dois dias após o transplante das mudas. A umidade foi mantida pesando-se cada recipiente e completando o volume de água até sua capacidade de campo.

A avaliação de fitotoxicidade das plantas foi realizada visualmente aos 3º, 7º, 11º e 14º dias após a aplicação do herbicida, em escala que variam de 0 a 100 (NASCIMENTO; YAMASHITA, 2009,) onde 0 é ausência de qualquer sintoma de fitotoxicidade e 100 caracteriza a morte da planta (Tabela 5).

No decimo quarto dia após a aplicação do produto, foi medida a altura das plantas, da região do colo até a gema terminal da haste principal. O material foi lavado e colocado para secar em estufa de circulação forçada de ar a 60°C por 72 horas, quando se determinou a matéria seca com o auxílio de uma balança de precisão.

Com os dados da matéria seca, altura da planta e fitotoxicidade determinou-se o I50 (dose necessária para redução de 50% da variável utilizada), com o objetivo de comparar a sensibilidade das espécies utilizadas (GUERRA, 2011) e estimou-se a curva de dose-resposta para as três espécies utilizadas neste trabalho.

Tabela 5. Escala de notas utilizadas para avaliação visual de fitotoxicidade do triclopyr em diferentes oleícolas (NASCIMENTO; YAMASHITA, 2009).

CONCEITO	NOTAS	OBSERVAÇÕES
Leve	0-20	Sintomas fracos ou poucos evidentes. Nota zero: não se observam quaisquer alterações nas plantas
Aceitável	21-40	Sintomas pronunciados, no entanto totalmente tolerados pela planta
Preocupante	41-50	Sintomas maiores que na categoria anterior, mas ainda passíveis de recuperação, e sem expectativas de redução no rendimento econômico.
Alta	51-70	Danos irreversíveis, com previsão de redução no rendimento econômico.
Muito alta	71-100	Danos irreversíveis muito severos, com previsão de redução drástica no rendimento econômico. Nota 100 para morte da planta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da toxicidade aguda CL50 ou CE50 48 h/7d para os organismos bioindicadores

Os valores das CL50 ou CE50 48h/7dias obtidos para cada espécie de bioindicadores foram analisados para classificar o triclopyr quanto ao seu potencial tóxico a organismos não alvo.

Na presença do triclopyr as macrófitas *L. minor* e *A. caroliniana*, não se desenvolveram conforme o esperado. No controle onde não ficaram expostas ao triclopyr as macrófitas apresentaram diferenças das demais concentrações. A macrófita *L. minor* nas concentrações 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 mg L⁻¹ teve seu crescimento reduzido, apresentando uma porcentagem de frondes com clorose de 12,7%; 17,3%; 38,7%, 44,7%, 74,6% e 100% respectivamente (Figura 2). As respostas biológicas como crescimento e morte das fronte indicam sensibilidade da *L. minor* aos herbicidas presentes na água (SANTOS et al., 2001).

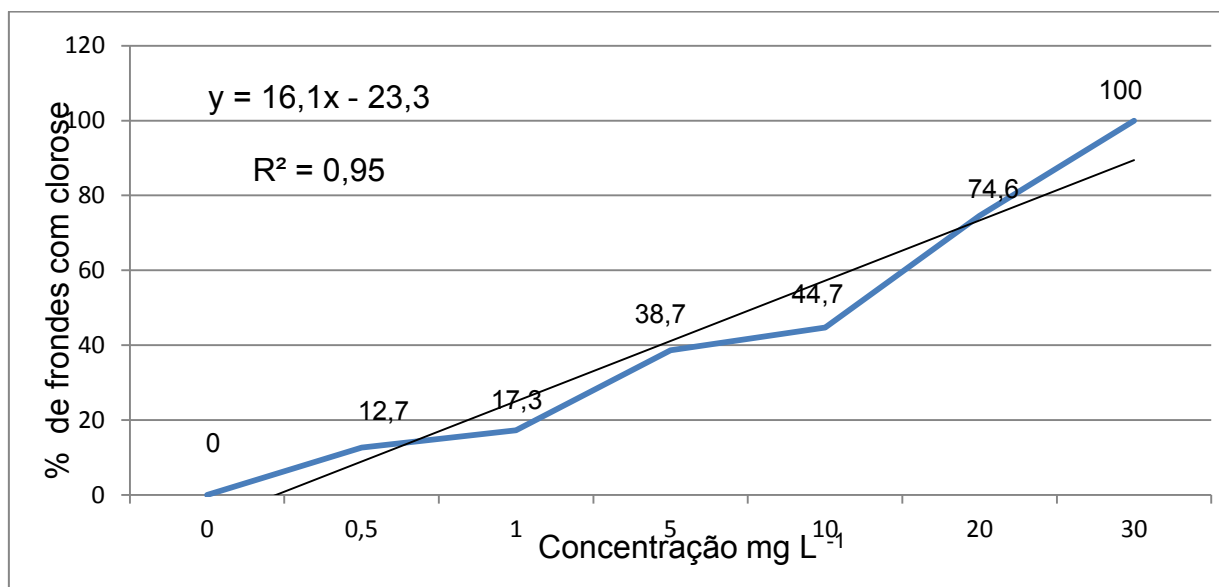


Figura 2. Representação gráfica das porcentagens de frondes de *Lemna minor* com clorose cultivadas em soluções com concentrações crescentes de triclopyr

Para *A. caroliniana* a relação concentração-porcentagem de inibição do crescimento encontra-se na Figura 3, onde pode ser observado que o triclopyr nas concentrações de 0,0 e 0,5 mg L⁻¹ não causou inibição no crescimento da planta, nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 mg L⁻¹ a porcentagem de inibição no crescimento foi 10, 15, 25, 70 e 100 % respectivamente. Nas concentrações acima de 5,0 mg L⁻¹ as plantas apresentaram em torno de 20% de queda de raízes e coloração das folhas num tom verde claro, nas concentrações a partir de 10 mg L⁻¹ as plantas estavam todas fragmentadas e na máxima concentração de 30 mg L⁻¹ todas as plantas estavam cloróticas. Segundo critérios de Velini et al.(1995), os sintomas foram classificados de acordo com a porcentagem de clorose e/ou necrose (Tabela 6).

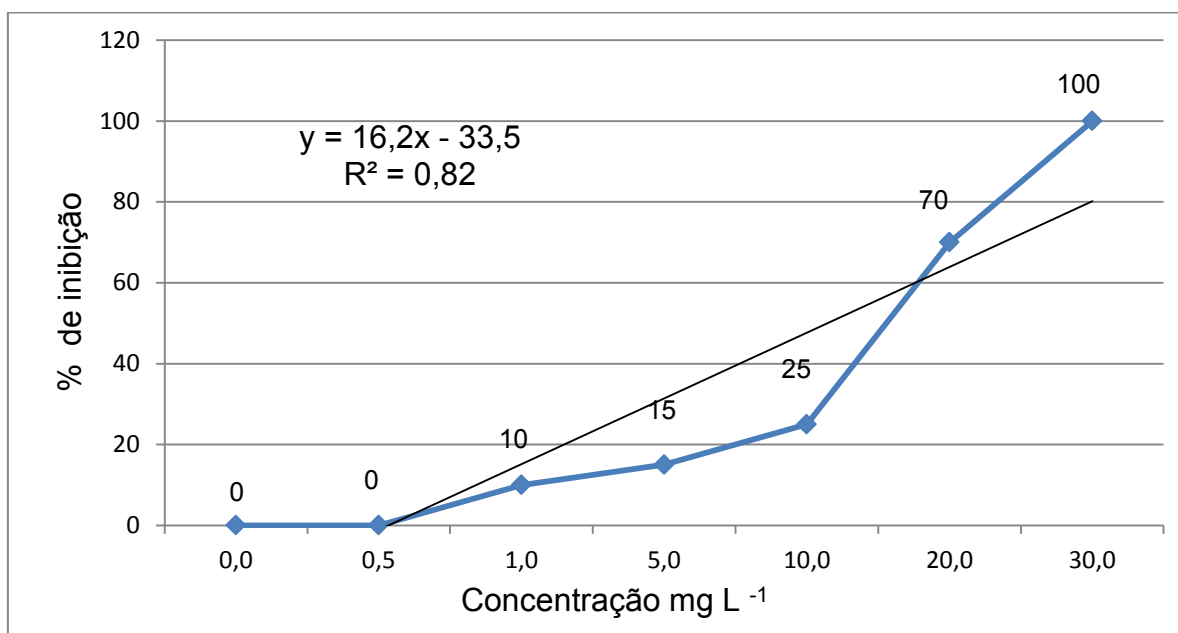


Figura 3. Representação gráfica das porcentagens de frondes de *Azolla caroliniana* com clorose cultivadas em soluções com concentração crescente de triclopyr

Tabela 6. Valores das porcentagens de inibição do crescimento em conjunto com sintomas de alterações morfológicas atribuídos às plantas de *Azolla caroliniana* e quantificação quanto ao critério apresentado por Vellini (1995).

Concentração mg. L ⁻¹	% inibição	Nota
0,0	0	E
0,5	0	E
1,0	10	E
5,0	15	E
10	25	E
20	70	D
30	100	A

Escala de notas porcentagem de mortalidade, A entre 91-100%; B entre 81-90%; C entre 71-80%, D entre 41-70%; e E entre 0 e 40%.

De acordo com os resultados obtidos pela análise de Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) os valores de CE50 do triclopyr foram de 10,52 mg L⁻¹ para *A. caroliniana* e de 6,95 mg L⁻¹ para *L. minor*. Considerando os critérios apresentados por Tucker (1985), o triclopyr foi classificado como moderadamente tóxico para *L. minor* e *A. caroliniana* por apresentar valores de CE50 entre 1 e 10 mg L⁻¹ (Tabela 7). Embora o valor para *A. caroliniana* fosse 10,52 mg L⁻¹, foi considerado como moderadamente tóxico por estar muito próximo do limite superior do critério e pode ser considerado dentro do erro experimental.

Tabela 7. Toxicidade aguda do triclopyr para as macrófitas *A. caroliniana* e *L. minor*.

CL50; 7 dias para o Herbicida Garlon			
Macrófitas	Limite - inferior (mg. L ⁻¹)	CE ₅₀ ; 7 dias (mg. L ⁻¹)	Limite - superior (mg. L ⁻¹)
<i>A. caroliniana</i>	9,21	10,52	12,01
<i>L. minor</i>	5,56	6,95	8,70

Os sintomas observados no crescimento e no aspecto das plantas de *L. minor* e *A. caroliniana* evidenciaram a toxicidade do triclopyr para estas plantas, o que era esperado por se tratar de um herbicida. Wong (2000) pondera que os herbicidas, quando atingem os corpos hídricos naturais podem causar toxicidade em macrófitas aquáticas. Efetivamente, Landolt e Kandeler (1987) em estudos ecotoxicológicos demonstraram que algumas macrófitas aquáticas sofreram alterações em relação ao crescimento e reprodução quando expostas a herbicidas.

A *Lemna minor* foi a espécie mais sensível, atingindo 50% de clorose e de redução de crescimento na concentração de 6,95 mg L⁻¹, enquanto que para a *A. caroliniana* a concentração foi de 10,52 mg L⁻¹ (Tabela 7). Esta é uma das razões pela qual *L. minor* é mais indicada como organismo bioindicador devido a sua maior sensibilidade à xenobiontes.

Os resultados obtidos nos testes de toxicologia aguda com o *H. eques*, *P. canaliculata* e *D. magna* estão apresentados na Tabela 8, onde estão os valores de CL50 ou CE50 48 horas. Para o peixe *H. eques* o valor de CL50 foi de 0,61 mg L⁻¹ considerado de alta toxicidade de acordo com o critério de Helfrich et al. (1996). Para a *P. canaliculata* o valor de CL50 foi 4,67 mg L⁻¹ considerado moderadamente tóxico pela classificação de Helfrich et al. (1996). Para o microcrustáceo *D. magna* o herbicida foi considerado altamente tóxico (ZUCKER, 1985) com valor de 0,62 mg L⁻¹ de CE50.

Tabela 8. Valores de parâmetro de toxicidade aguda CE50 e CL50 do triclopyr para *Pomacea canaliculata*, *Daphnia magna* e *Hypessobrycon eques* obtidos pela análise de “Trimmed Sperman-Karber”.

CE50; 48 horas para o Herbicida Garlon.			
	L. inferior (mg L⁻¹)	CL₅₀; 7dias (mg L⁻¹)	L. superior (mg L⁻¹)
<i>Pomacea canaliculata</i>	3,50	4,67	6,25
<i>Daphnia magna</i>	0,45	0,62	0,87
CL50; 48 horas para o Herbicida Garlon			
<i>Hypessobrycon eques</i>	0,57	0,61	0,66

No herbicida Garlon 480BR, o triclopyr se encontra na formulação de este butoxiétílico que é solúvel em água, isto influencia a sua toxicidade no ambiente aquático. Os agentes químicos solúveis em água podem penetrar mais rapidamente num organismo aquático através de toda a superfície do corpo, guelras e boca (RAND; PETROCELLI, 1985; SILVA; SANTOS, 2007).

A toxicidade depende da suscetibilidade dos organismos ao composto químico. A formulação éster é altamente tóxica para peixes e invertebrados aquáticos com uma CL50 (96horas) de 0,74 mg L⁻¹ para *Oncorhynchus mykiss* e 0,87 mg L⁻¹ para *Lepomis macrochirus* (WSSA, 1994; USEPA, 1998). A natureza hidrofóbica do éster permite que ele seja facilmente absorvido através dos tecidos de peixes, onde é rapidamente convertido em ácido triclopyr. O ácido pode se acumular em níveis tóxicos quando os peixes são expostos a concentrações e período de tempo suficiente. A extensão com que os efeitos tóxicos do éster são

reduzidos por degradação é mal explicado ou entendido, mas estudos tem demonstrado que a formulação éster degrada rapidamente às formas menos tóxicas (THOMPSON et al., 1991).

Para o *H. eques* nas concentrações de 0,0 e 0,1 mg L⁻¹ não ocorreu mortalidade. Nas concentrações de 0,5 e 0,75 mg L⁻¹ as mortalidades foram de 11% e 89%, respectivamente e nas concentrações de 1,0 e 2,5 mg L⁻¹ a mortalidade foi de 100% (Figura 4).

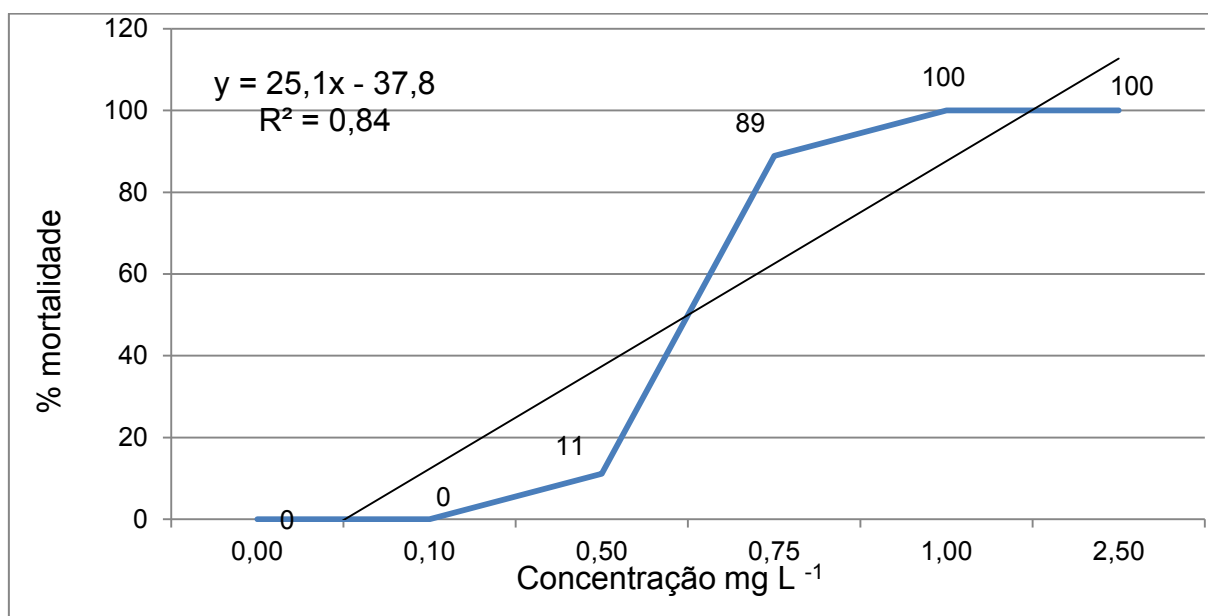


Figura 4. Representação gráfica das porcentagens de mortalidade de *Hypessobrycon eques* em soluções com concentração crescente de triclopyr.

Para *D. magna* nas concentrações de 0,0 e 0,05 mg L⁻¹ não ocorreu mortalidade, em 0,10; 0,5; 0,90; 1,30 e 1,70 mg L⁻¹ as mortalidades foram de 13%, 20%, 47%, 87% e 100%, respectivamente (Figura 5).

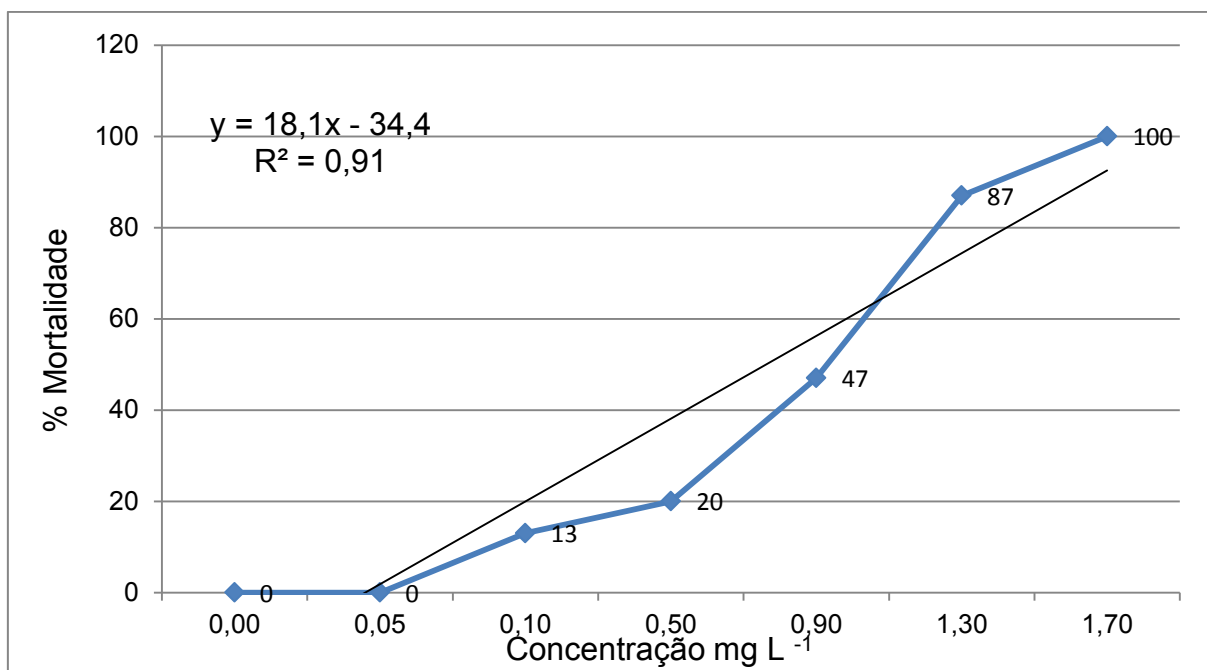


Figura 5. Representação gráfica das porcentagens de mortalidade de *Daphnia magna* em soluções com concentrações crescentes de triclopyr.

As espécies *D. magna* e *H. eques* são as mais adequadas como organismos bioindicadores, por apresentarem os menores valores de CE50, 48h e CL50, 48h de 0,62 e 0,63 mg L⁻¹, respectivamente. Na relação concentração – mortalidade as duas espécies responderam de forma linear, com o aumento das concentrações de triclopyr na água ocorreu aumento da mortalidade e isto facilita a avaliação dos organismos no ambiente aquático (Figura 4 e 5).

Brigante e Espíndola (2003) comprovaram que os peixes e as *daphnias* são os principais bioindicadores de contaminação da água por serem consumidores primários e por apresentarem respostas a baixas concentrações do xenobiontes, evitando assim que a contaminação chegue a provocar desequilíbrio aos outros níveis da cadeia alimentar.

Para *P. canaliculata* na concentração de 0,0 não houve mortalidade ou imobilidade, em 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L⁻¹ as mortalidades foram de 7%, 13%, 20%, 20%, 93% e 100%, respectivamente (Figura 6).

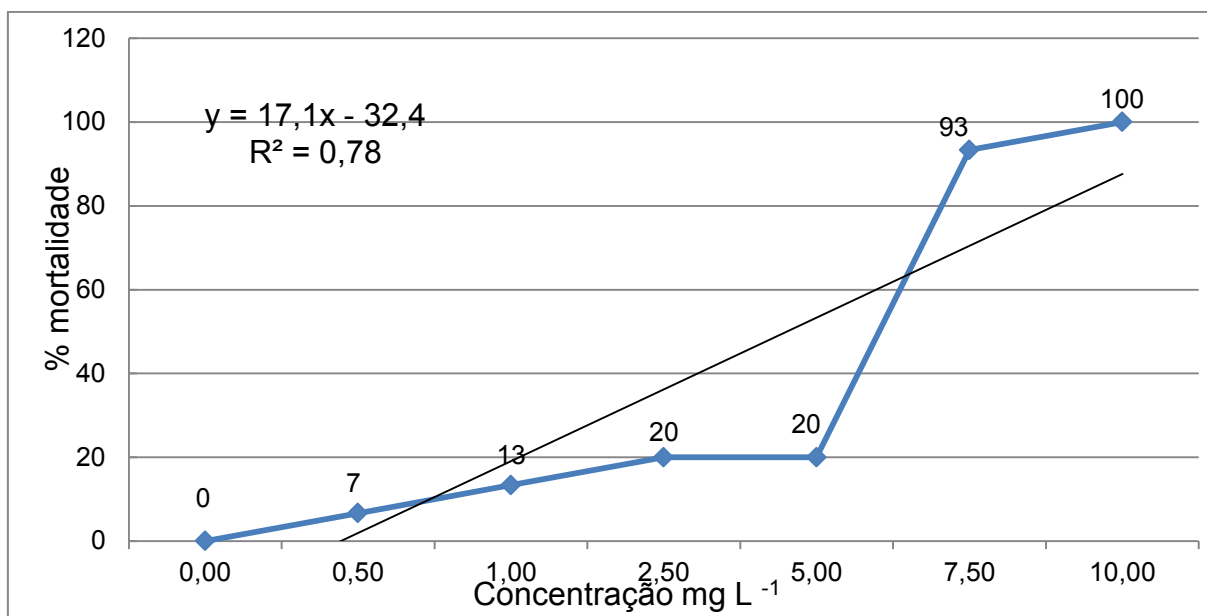


Figura 6. Representação gráfica das porcentagens de mortalidade de *Pomacea canaliculata* em soluções com concentrações crescentes de triclopyr

Para o triclopyr não foi encontrado dado sobre toxicidade aguda em *A. caroliniana* e *P. canaliculata*, espécies para as quais este herbicida é moderadamente tóxico, como foi observado pelos resultados obtidos. Assim sendo, com o conhecimento dos valores das CL50 e CE50 torna-se possível estimar ou conhecer em que concentração do triclopyr que tem risco de causar contaminação do ambiente aquático.

4.2. Classificação do risco de intoxicação ambiental do triclopyr

Os quocientes de risco de intoxicação ambiente (Q) calculados para o triclopyr em uma lâmina-d'água de 0,3 m encontra-se na tabela 9.

A classificação do triclopyr usando o modelo de Goktepe et al (2004) na máxima dose recomendada (2 L ha⁻¹) apresentou risco médio para *A. caroliniana* e *L. minor*. Na dose de 50 % (1 L ha⁻¹) o herbicida apresentou risco médio para *P. canaliculata*. Para *D. magna* e *H. eques* o triclopyr apresenta alto risco de causar efeitos adversos quando utilizado nas doses de 100% (2L ha⁻¹) e 50 % (1L ha⁻¹) e médio risco quando utilizado nas doses de 25, 12,5, 6,25 % (Tabela10).

Tabela 9. Valores dos quocientes de risco ambiental para o triclopyr em um corpo de água com profundidade de 0,30 m para os bioindicadores estudados. Os cálculos utilizaram o modelo de Goktepe et al. (2004).

Espécie indicadora	Valores de Q em diferentes diluições do triclopyr						
	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	1,56%
<i>A.caroliniana</i>	0,063	0,031	0,016	0,007	0,0038	0,0019	0,00095
<i>L. minor</i>	0,096	0,047	0,024	0,012	0,006	0,003	0,0014
<i>H. eques</i>	1,09	0,54	0,28	0,14	0,068	0,034	0,017
<i>P.canaliculata</i>	0,14	0,07	0,036	0,018	0,0089	0,0044	0,0021
<i>D. magna</i>	1,08	0,53	0,27	0,13	0,067	0,033	0,016

Tabela 10. Classificação de risco ambiental para diferentes diluições de triclopyr em um corpo de água com profundidade de 0,30 m em diferentes espécies (GOKTEPE et al. 2004).

Espécie indicadora	Baixo risco	Médio risco	Alto risco
	Q < 0,05	0,05 > Q < 0,5	Q > 0,5
<i>A.caroliniana</i>	50; 25, 12,5, 6,25; 3,12 e 1,56%	100%	
<i>L. minor</i>	50; 25, 12,5, 6,25; 3,12 e 1,56%	100%	
<i>P. canaliculata</i>	25, 12,5, 6,25; 3,12 e 1,56%	50 e 100%	
<i>H. eques</i>	3,12 e 1,56	25, 12,5 e 6,25	50 e 100%
<i>D. magna</i>	3,12 e 1,56	25, 12,5 e 6,25	50 e 100%

Segundo os modelos adotados pela USEPA (1987) e Urban e Cook (1986), considerando uma lâmina-d'água de 0,3 m o triclopyr não apresenta risco para *A. caroliniana* e *L. minor*, mesmo na máxima dose (2L ha^{-1}). Para a *P. canaliculata* o triclopyr apresenta baixo risco e nenhum risco de intoxicação ambiental nas doses de 100% e 50% L ha^{-1} (Tabela 11 e 12).

O risco de intoxicação do triclopyr para *D. magna* e *H. eques* segundo a classificação de Urban e Cook (1986), aponta a possibilidade de efeito adverso para as doses acima de 12,5% que corresponde a 250 ml ha⁻¹ e de sem risco de efeito adverso para as doses abaixo de 6,25% que corresponde á 125 ml ha⁻¹ (Tabela 11).

Tabela 11. Classificação de risco ambiental para diferentes diluições de triclopyr em um corpo de água com profundidade de 0,30 m em diferentes espécies (URBAN; COOK, 1986).

Espécie indicadora	Risco com nenhum efeito adverso Q < 0,1	Risco com possibilidade de efeito adverso 0,1> Q < 10	Risco com probabilidade de efeito adverso graves Q > 10
<i>A. caroliniana</i>	Todas as doses	-	-
<i>L. minor</i>	Todas as doses	-	-
<i>P. canaliculata</i>	50, 25, 12,5, 6,25; 3,12; 1,56%	100%	-
<i>H. eques</i>	6,25; 3,12 e 1,56	12,5; 25; 50 e 100%	-
<i>D. magna</i>	6,25; 3,12 e 1,56	12,5; 25; 50 e 100%	-

O risco de intoxicação do triclopyr para *D. magna* e *H. eques* segundo a classificação da USEPA (1987), apresenta risco moderado para a dose de 2 L ha⁻¹ (100%), baixo risco para as doses de 1 L ha⁻¹ (50%) , 0,5 L ha⁻¹ (25%) e 0,25 L ha⁻¹ (12,5%) L ha⁻¹ e sem risco na dose de 0,25 L ha⁻¹ (6,25%) (Tabela 12).

Tabela 12. Classificação de risco ambiental para diferentes diluições de triclopyr em um corpo de água com profundidade de 0,30 m em diferentes espécies (USEPA, 1987)

Espécie indicadora	Sem risco Q < 0,1	Risco Baixo 0,1 > Q < 1,0	Risco moderado 1,0 > Q < 10
<i>A. caroliniana</i>	Todas as doses	-	-
<i>L. minor</i>	Todas as doses	-	-
<i>P. canaliculata</i>	50, 25, 12,5, 6,25; 3,12; 1,56%	100%	-
<i>H. eques</i>	6,25; 3,12 e 1,56	12,5; 25 e 50%	100%
<i>D. magna</i>	6,25; 3,12 e 1,56	12,5; 25 e 50%	100%

Os quocientes de risco ambiental (Q) do triclopyr para uma lâmina-d'água de 2,0 m encontra-se na tabela 13. O triclopyr pela Classificação de Goktepe et al (2004), na máxima dose recomenda apresentou baixo risco de provocar reações adversas em *L. minor*, *A. caroliniana* e *P. canaliculata*. Para *D. magna* e *H. eques* o triclopyr apresenta médio risco de causar efeitos adversos quando utilizado na dose de 100 (2L ha⁻¹) e 50 % (1L ha⁻¹) (Tabela14).

Tabela 13. Valores dos quocientes de risco ambiental de diferentes diluições do triclopyr para diferentes espécies em um corpo de água com profundidade de 2,0 m segundo o critério de Goktepe et al. (2004).

Espécie	Valores de Q em diferentes diluições do triclopyr						
	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	1,56%
<i>A.caroliniana</i>	0,0095	0,0047	0,0024	0,0011	0,0006	0,0003	0,00015
<i>L. minor</i>	0,014	0,007	0,004	0,0017	0,00089	0,00045	0,00023
<i>H. eques</i>	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	0,0026
<i>P.canaliculata</i>	0,021	0,01	0,005	0,002	0,0013	0,0006	0,00034
<i>D. magna</i>	0,15	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	0,0025

Tabela 14. Classificação de risco ambiental para diferentes diluições de triclopyr em um corpo de água com profundidade de 2,00 m em diferentes espécies (GOKTEPE et al, 2004).

Espécie indicadora	Baixo risco < 0,05	Médio risco 0,05 – 0,5	Alto risco >0,5
<i>A. caroliniana</i>	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56		----
<i>L. minor</i>	100,50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56%		----
<i>P. canaliculata</i>	100,50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56%		----
<i>H. eques</i>	25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56%	50 e 100%	----
<i>D. magna</i>	25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56%	50 e 100%	----

A classificação para o triclopyr segundo a USEPA (1987) e Urban e Cook (1986), considerando lâmina-d 'água de 2,0 m não demonstrou riscos de efeitos adversos na dose de 2 L ha⁻¹ para as espécies de *A. caroliniana*, *L. minor* e *P. canaliculata*. Para *H. eques* e *D. magna*, as doses de 2 e 1 L ha⁻¹ apresentaram baixo e nenhum risco de efeitos adversos, respectivamente (Tabela 15 e 16).

Tabela 15. Classificação de risco ambiental para diferentes diluições de triclopyr em um corpo de água com profundidade de 2,0m em diferentes espécies (URBAN, COOK, 1986).

Espécie Indicadora	Risco com nenhum efeito adverso Q < 0,1	Risco com possibilidade de efeito adverso 0,1> Q < 10	Risco com probabilidade de efeito adverso graves Q > 10
<i>A.caroliniana</i>	Todas as doses	-	-
<i>L. minor</i>	Todas as doses	-	-
<i>P. canaliculata</i>	Todas as doses	-	-
<i>H. eques</i>	50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56%	100%	-
<i>D. magna</i>	50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56%	100%	-

Tabela 16. Classificação de risco ambiental para diferentes diluições de triclopyr em um corpo de água com profundidade de 2,0m em diferentes espécies (USEPA, 1987).

Espécie indicadora	Sem risco $Q < 0,1$	Risco Baixo $0,1 > Q < 1,0$	Risco moderado $1,0 > Q < 10$
<i>A.caroliniana</i>	Todas as doses	-	-
<i>L. minor</i>	Todas as doses	-	-
<i>P. canaliculata</i>	Todas as doses	-	-
<i>H. eques</i>	50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56	100%	-
<i>D. magna</i>	50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56	100%	-

Os resultados indicam uma grande variação dos valores da toxicidade aguda e do quociente de intoxicação ambiental do triclopyr para as espécies avaliadas nesta pesquisa. O efeito de um pesticida no meio ambiente depende das concentrações dos compostos tóxicos nos diferentes compartimentos solo, água, planta e atmosfera e estas são influenciadas pela tecnologia e condições da aplicação, da quantidade ou dose usada, do comportamento e destino do produto no ambiente (SPADOTTO et al., 2004).

A determinação do risco de intoxicação do triclopyr é muito importante para avaliar sua periculosidade ambiental. A dose recomendada para utilização agrícola é normalmente de 2 L ha⁻¹ e apenas pequena parcela do produto atingirá os corpos hídricos em condições normais de aplicação. Assim, considerando que o risco é caracterizado pela interação entre toxicidade e exposição, não são esperados problemas de intoxicação ambiental com este herbicida, a menos que se efetuem aplicações diretas em coleções d'água.

4.3. Determinação da eficácia do triclopyr em plantas aquáticas

O triclopyr na formulação Garlon 480 BR nas doses de 0,5; 1,0; 20; 3,0 e 4,0 L ha⁻¹, foi eficaz no controle das macrófitas *Nymphaeaceae aquatica* e *Myriophyllum aquaticum*. As plantas da testemunha continuaram saudáveis, com brotos em crescimento, apresentando uma diferença significativa das plantas tratadas com o triclopyr.

O *M. aquaticum* é uma espécie muito sensível ao herbicida triclopyr, a partir da dose de 0,5 L ha⁻¹ no terceiro dia após aplicação, todas as plantas apresentaram epinastia, com um controle excelente da espécie (Figura 6). O triclopyr na formulação Renova foi eficaz em 100% na biomassa para *M. aquaticum* na concentração de 0,27 mg i.a. L⁻¹ após um tempo de exposição de 24 horas (POOVEY et al., 2007).

No 30 ° dia após a aplicação observou-se rebrota em uma unidade e em três unidades experimentais nas concentrações de 0,5 e 1,0 L ha⁻¹ (Tabela 17, Figura 6). O *M. aquaticum* se reproduz por sementes, mas sua disseminação também é feita por fragmentos ou pequenas estruturas das plantas, o que compromete o uso de técnicas de controle mecânico e onde pode ocorrer rebrota quando se realiza o controle químico (REYNOLDS, 1999).

A partir da concentração de 2,0 L ha⁻¹ o controle do *M. aquaticum* foi de 100% considerado excelente (Tabela 17, Figura 7) e a partir do 15º após aplicação as plantas estavam apodrecidas e foram se deteriorando. Hofstra et al. (2006), avaliaram o triclopyr em condições de mesocosmo e observaram que a aplicação de doses maiores que 2,0 Kg i.a. ha⁻¹ proporcionou controle completo do *M. aquaticum*.

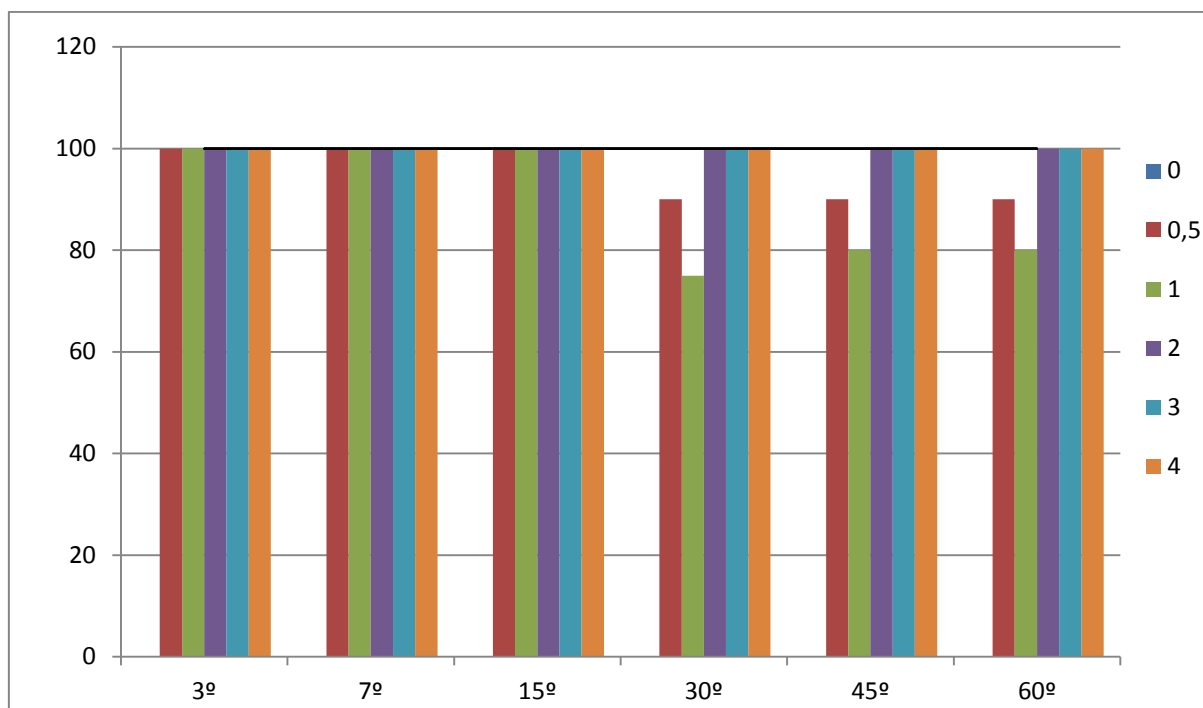


Figura 7. Porcentagem de inibição do desenvolvimento de *Myriophyllum aquaticum* aos 3º, 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dias após a aplicação do herbicida triclopyr nas doses de 0,5; 1,00; 2,00; 3,00; e 4,00 L ha⁻¹.

Tabela 17. Eficácia de controle (%) do triclopyr para o *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) (ALAM, 1974).

Dose l ha ⁻¹	Eficácia de controle (%) dias após aplicação (DAA)					
	3º	7º	15º	30º	45º	60º
0,0	0	0	0	0	0	0
0,5	100	100	100	90	90	90
1,0	100	100	100	75	80	80
2,0	100	100	100	100	100	100
3,0	100	100	100	100	100	100
4,0	100	100	100	100	100	100

Para *Nymphoide aquatica*, no primeiro dia após a aplicação do triclopyr as plantas que receberam a aplicação apresentaram perda de sustentação, que é um dos efeitos típico dos herbicidas mimetizadores das auxinas que atuam nos tecidos sustentação das plantas (Figura 8). Na 45º dia após a aplicação na concentração de 0,5 L ha⁻¹ ocorreu rebrota em quatro repetições com três plantas em cada.

No 60º dia após aplicação na concentração de 0,5 L ha⁻¹ já foram observados rebrota em todas as unidades experimentais e na concentração 1,0 L ha⁻¹ ocorreu rebrota de uma planta em uma unidade experimental (Tabela 18 e Figura 8). O controle para *N. aquatica* foi excelente a partir da concentração de 1,0 L ha⁻¹, sendo que a partir do 15º dias após a aplicação o controle já era de 100% da espécie (Tabela 18).

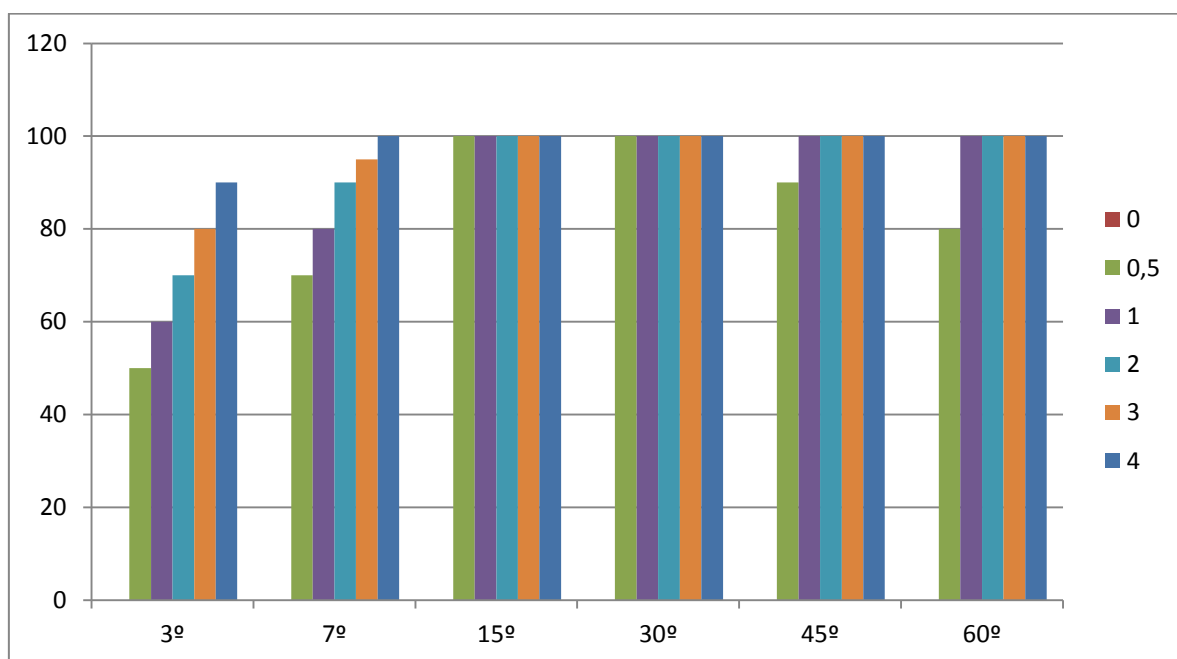


Figura 8. Porcentagem de inibição do desenvolvimento de *Nymphoide aquatica* aos 3º, 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dias após a aplicação do herbicida triclopyr nas doses de 0,5; 1,00; 2,00; 3,00; e 4,00 L ha⁻¹.

Tabela 18. Eficácia de controle (%) do triclopyr para a *Nymphaea aquatica* (ALAM 1974).

Dose l ha ⁻¹	Eficácia de controle (%) dias após aplicação (DAA)					
	3°	7°	15°	30°	45°	60°
0,0	0	0	0	0	0	0
0,5	50	70	100	100	90	80
1,0	60	80	100	100	100	100
2,0	70	90	100	100	100	100
3,0	80	95	100	100	100	100
4,0	90	100	100	100	100	100

Para as espécies *N. aquatica* e *M. aquaticum* nas doses de 2,0; 3,0 e 4,0 l ha⁻¹ no 60° após a aplicação, os tecidos foliares apresentavam em estado de decomposição e os aquários foram colonizados por algas e *Azolla*, mas nas concentrações de 0,5 e 1,0 L ha⁻¹ observou-se a emissão de novos brotos, embora as plantas não recuperassem nem 15% da sua biomassa. O triclopyr na formulação Garlon 3, foi eficaz no controle do *Myriophyllum* a partir da concentração de 2,5 L ha⁻¹ e nas concentrações 0,5 e 1,0 também observaram brotação a partir do 35° DAA, mas sem recuperar 10% da matéria seca (KURT; SUSAN, 2003), para a espécie *N. aquatica* não foi encontrado relatos na literatura sobre a eficácia do triclopyr.

O *Limnobium laevigatum* das espécies analisadas neste trabalho foi a mais resistente ao triclopyr. No 7° dia após a aplicação até a concentração de 3,0 L ha⁻¹, o triclopyr não apresentou controle sobre a espécie, pois não passou de 40% (ALAM, 1974) (Tabela 19 e Figura 9). O controle foi considerado suficiente a partir da concentração de 2,0 L ha⁻¹ e a partir do 15° dia após a aplicação que foi observada a redução da biomassa e as cloroses nas plantas foram evidente, com controle de 45% quando comparado com a testemunha (Tabela 19 e Figura 9).

Tabela 19. Eficácia de controle (%) do triclopyr para o *Limnobium laevigatum* (ALAM 1974).

Dose l ha ⁻¹	Eficácia de controle (%) dias após aplicação (DAA)					
	3°	7°	15°	30°	45°	60°
0,0	0	0	0	0	0	0
0,5	10	20	20	20	30	40
1,0	20	30	35	35	40	50
2,0	30	40	45	50	55	60
3,0	40	40	50	50	60	65
4,0	50	50	60	70	75	80

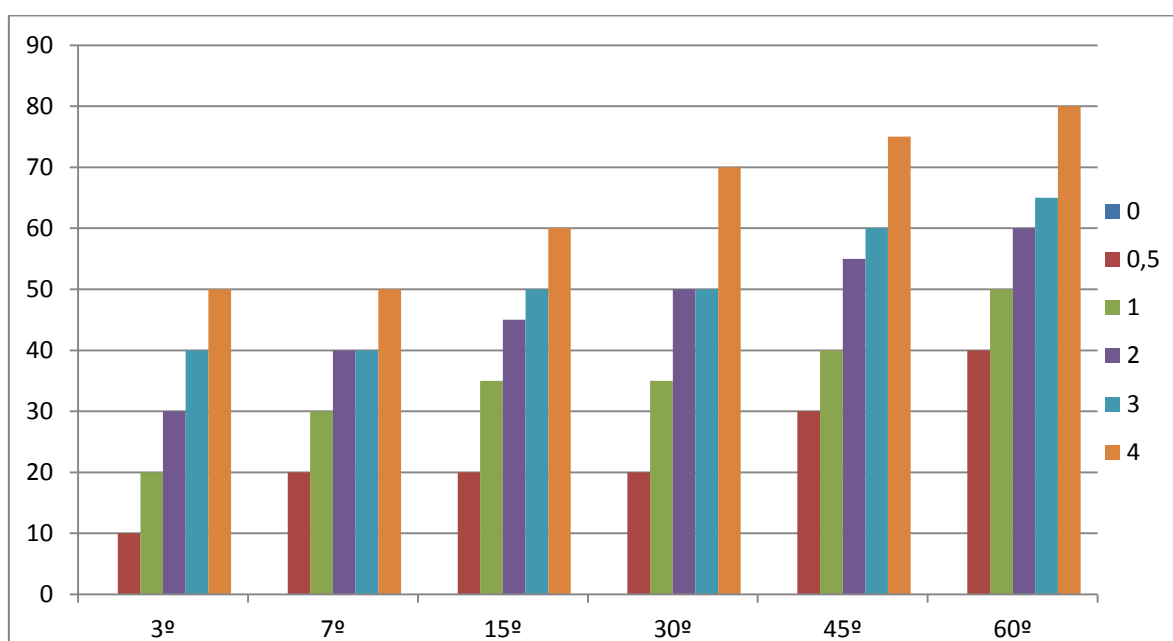


Figura 9. Porcentagem de inibição do desenvolvimento de *Limnobium laevigatum* aos 3°, 7°, 15°, 30°, 45° e 60° dias após a aplicação do herbicida triclopyr nas doses de 0,5; 1,00; 2,00; 3,00; e 4,00 L ha⁻¹.

O triclopyr não controlou totalmente a espécie *L. laevigatum*, ao 60° dia após a aplicação observou-se redução de 44, 49, 56, 63 e 76% na produção de matéria seca nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 L ha⁻¹ respectivamente, quando comparada com a testemunha (Figura 10). Com isso segundo os conceitos utilizados por Alam (1974), nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 L ha⁻¹ o controle foi regular, pois a redução da matéria seca ficou no intervalo de 41-60%, na

concentração de 3,0 L ha⁻¹ apresentou controle considerado suficiente com a redução da matéria seca no intervalo de 61- 70% e na máxima dose utilizada de 4,0 l ha⁻¹ o controle foi considerado como bom, sendo que a redução de matéria seca ficou no intervalo de 71- 80% quando comparados com a testemunha.

Para o *L. laevigatum* o controle não chegou a 100% aos 60º dia após a aplicação do triclopyr, atingindo um controle considerado bom na dose de 3,0 l ha⁻¹, mas esta dose excede a dose recomendada de 2,0 l ha⁻¹ que é a dose que não coloca em risco o equilíbrio do ecossistema aquático, portanto o triclopyr não é recomendado para ser utilizado no controle da macrófita *L. laevigatum*.

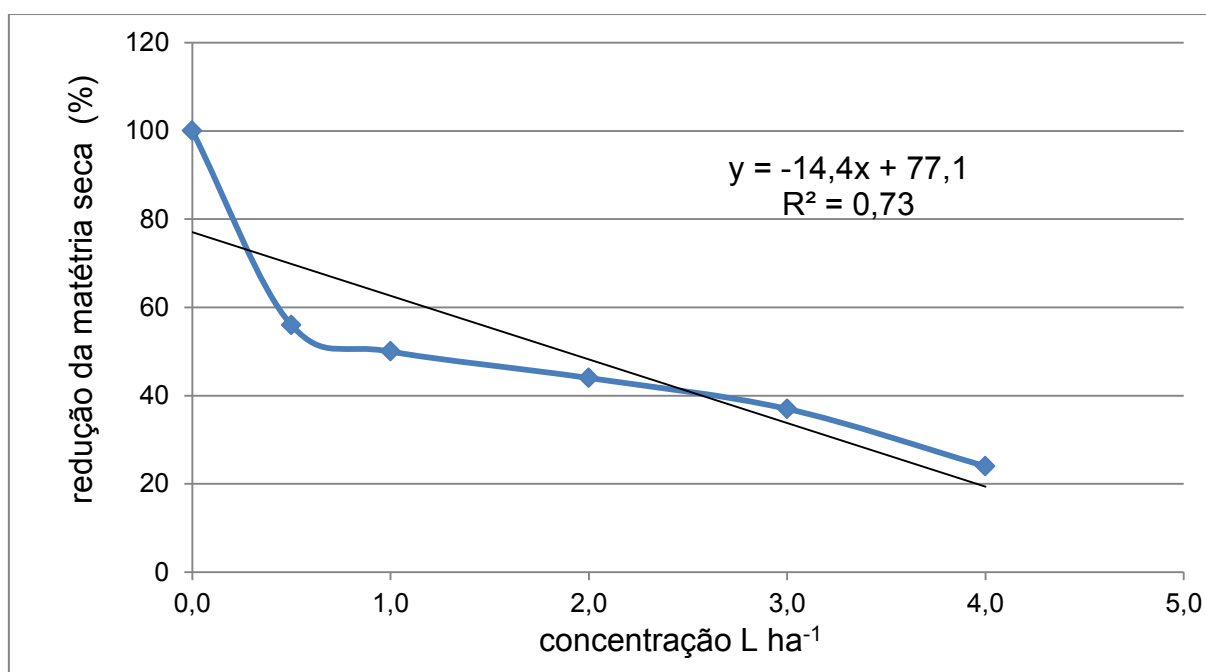


Figura 10. Produção de matéria seca em função das concentrações de triclopyr para *Limnobium laevigatum*, no 60º dia após a aplicação do herbicida.

Os conjuntos de observações sugerem que nem todo herbicida e/ou na dose testada tem atuação efetiva no controle de dada macrófita aquática. Provavelmente a diversidade morfológica da superfície foliar existente entre as espécies de plantas aquáticas e a presença de estruturas foliares, tais como tricomas, estômatos, cutícula e ceras, pode exercer grande influência na aderência e deposição das gotas de pulverização, assim como na absorção do herbicida, potencializando ou reduzindo sua efetividade (COSTA et al. 2005). Além do mais, provavelmente há

certa especificidade entre a macrófita aquática problema, devido à atividade, uso, modo de ação e grupo químico do herbicida.

4.4. Determinação das plantas indicadoras do triclopyr no solo

As espécies *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum* e *Raphanus sativus* apresentaram sensibilidade ao triclopyr. Na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de triclopyr no solo o tomate apresentou fitotoxicidade com sintomas pronunciados, mas totalmente tolerados pelas plantas, já na concentração de 1,0 mg L⁻¹ demonstrou fitotoxicidade alta, evidenciando danos irreversíveis, com previsão de redução no rendimento econômico. Para as concentrações de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ a fitotoxicidade foi considerada muito alta, com danos irreversíveis muito severos, com previsão de redução drástica no rendimento econômico. No 14º dia após a aplicação do triclopyr, a mortalidade foi de 100% na concentração de 5,0 mg L⁻¹ (Tabela 17 e Figura 6).

Tabela 17. Avaliação visual dos sintomas de fitotoxicidade das concentrações do triclopyr em diferentes épocas após a aplicação em *Solanum lycopersicum*

Concentração mg L ⁻¹	Dias após a aplicação				Nota
	3º	7º	11º	14º	
0,00	0	0	0	0	leve
0,50	0	0	1	2	aceitável
1,00	3	4	6	6	alta
2,50	3	7	7	9	muito alta
5,00	4	9	9	10	muito alta

Na Figura 06 estão graficamente apresentadas as relações entre a concentração de triclopyr e avaliação dos sintomas de fitotoxicidade aos 14 dias após a aplicação em plantas de *S. Lycopersicum*.

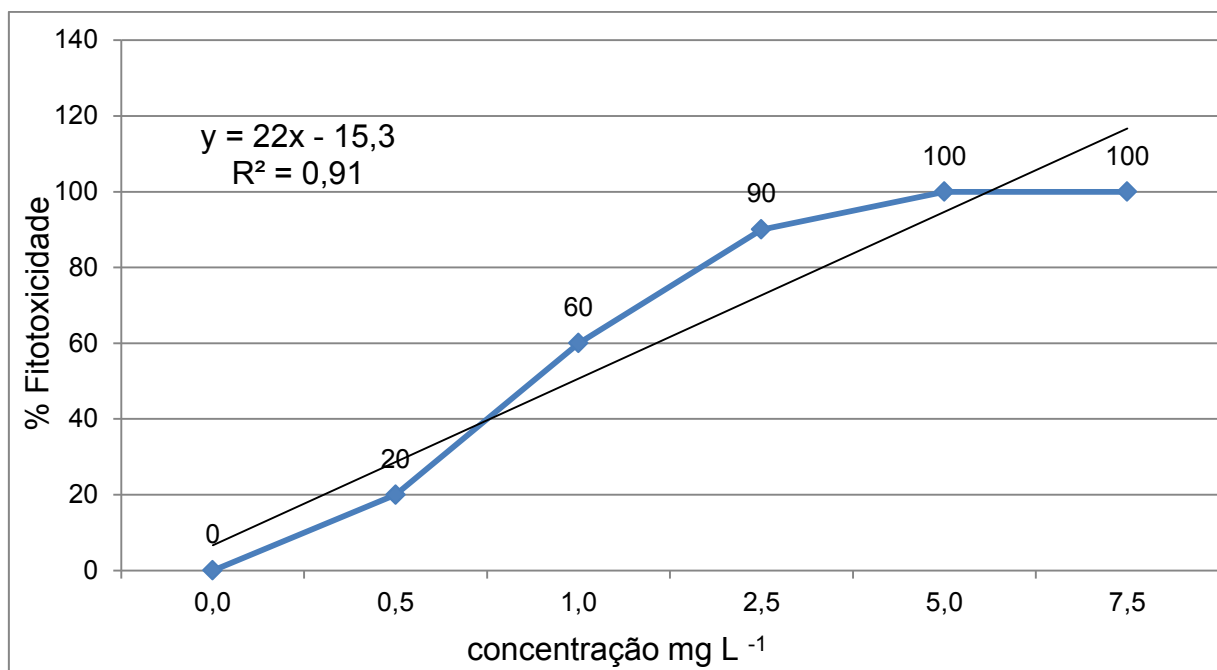


Figura 6. Representação gráfica da relação entre a concentração de triclopyr e as notas do sintoma de fitotoxidade em plantas de *Solanum Lycopersicum* aos 14 dias após a aplicação.

O pepino na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de triclopyr no solo apresentou fitotoxidade com sintomas pronunciados, mas totalmente tolerados pelas plantas. Dentre as espécies estudadas o pepino apresentou maior sensibilidade, pois na dose de 1,0 mg L⁻¹ a fitotoxidade foi muito alta com 100% de mortalidade no 14º dia após a aplicação (Tabela 18 e Figura 7). Os herbicidas Triclopyr e 2,4-D apresentam inicialmente grande efeito deletério nas plantas de pepino proporcionando decréscimo da massa seca da parte aérea e grande porcentagem de intoxicação (SANTOS et al, 2012).

Tabela 18. Avaliação visual dos sintomas de fitotoxicidade das concentrações do triclopyr em diferentes épocas após a aplicação em *Cucumis sativus*.

Concentração mg L ⁻¹	Dias após aplicação				Nota
	3 ^o	7 ^o	11 ^o	14 ^o	
0,00	0	0	0	0	leve
0,50	0	1	2	3	aceitável
1,00	3	9	9	10	muito alta
2,50	3	7	8	10	muito alta
5,00	4	9	9	10	muito alta

Na Figura 07 encontram-se graficamente apresentadas as relações entre a concentração de triclopyr e avaliação dos sintomas de fitotoxicidade aos 14 dias após a aplicação em plantas de *C. sativus*.

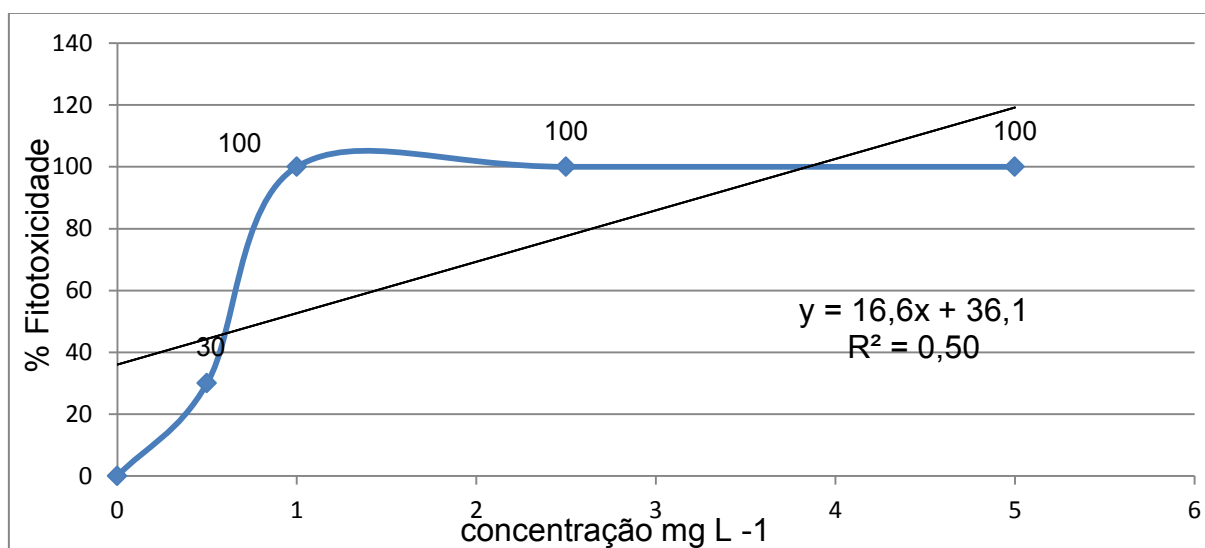


Figura 7. Representação gráfica da relação entre a concentração de triclopyr e as notas do sintoma de fitotoxicidade em plantas de *Cucumis sativus* aos 14 dias após aplicação.

O rabanete foi à espécie menos sensível ao triclopyr. Nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,5 mg L⁻¹ os sintomas de fitotoxicidade foram leve, aceitável e preocupante, respectivamente (Tabela 19 e Figura 8). Nas concentrações de 5,0 e 7,5 mg L⁻¹ a fitotoxicidade foi considerada muito alta, onde as taxas de mortalidade das plantas no 14^o dia após a aplicação foram de 90% e 100% respectivamente. Para o pepino e o tomate ocorreram 100% de mortalidade na concentração de 5,0 mg L⁻¹ no 14^o dia após a aplicação.

Tabela 19. Avaliação visual dos sintomas de fitotoxicidade das concentrações do triclopyr em diferentes épocas após a aplicação em *Raphanus sativus*.

Concentração mg L ⁻¹	Dias após a aplicação				Nota
	3 ^o	7 ^o	11 ^o	14 ^o	
0,00	0	0	0	0	leve
0,50	0	1	1	1	leve
1,00	1	2	2	3	aceitável
2,50	1	3	4	5	preocupante
5,00	4	7	8	9	muito alta
7,5	3	8	9	10	Muito alta

Na Figura 8 estão graficamente apresentadas as relações entre a concentração de triclopyr e avaliação dos sintomas de fitotoxicidade aos 14 dias após a aplicação em plantas de *Raphanus sativus*.

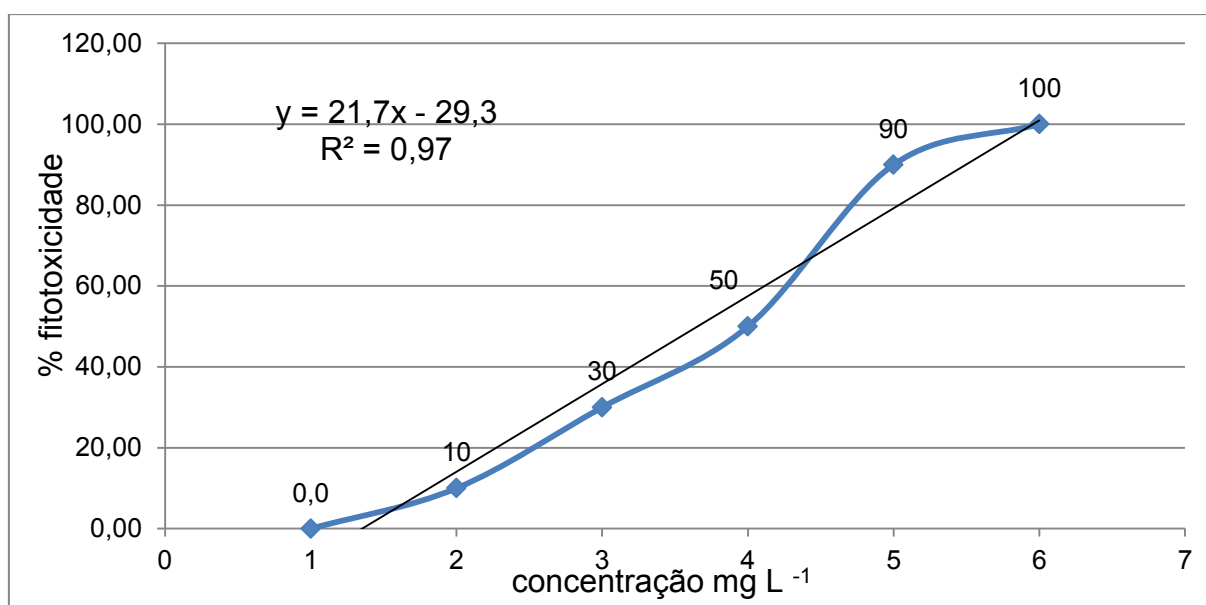


Figura 8. Representação gráfica da relação entre a concentração de triclopyr e as notas do sintoma de fitotoxicidade nas plantas de *Raphanus sativus* aos 14 dias após a aplicação.

A escolha destas espécies como plantas indicadoras para quantificação do triclopyr no solo é limitada porque nas doses utilizadas do herbicida houve elevada redução da vegetação, isto indica a presença do herbicida no solo, mas dificulta a

quantificação dos produtos e das variáveis quantitativas. A planta indicadora da presença de determinado herbicida é aquela que apresenta qualquer nível de sensibilidade, mas caso a sensibilidade da planta ao herbicida seja elevada, a planta responderá em faixa de dose muito limitada uma vez que as curvas de dose-resposta perdem a significância (NUNES; VIDAL, 2009).

Os sintomas de intoxicação visual são as variáveis mais indicadas para a avaliação da presença de resíduos de herbicidas auxínicos como 2,4D e o picloram (SANTOS et al., 2013). Talvez, num trabalho futuro, seja interessante estudar outros materiais genéticos destas plantas ou mesmo procurar outras plantas bioindicadores que mostrassem mais sutilmente as diferenças de respostas às concentrações do triclopyr.

Os valores observados para altura da planta e biomassa seca das espécies *C. sativus*, *S. lycopersicum* e *R. sativus* foram inversamente proporcional ao aumento das doses do triclopyr.

O triclopyr reduziu o acúmulo de matéria seca total para as espécies avaliadas e observou-se queda acentuada para tomate e rabanete a partir da concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Figuras 9, 10 e 11) isto demonstra uma alta sensibilidade das espécies à presença de baixas concentrações do triclopyr no solo. No entanto ocorreu diferença nos níveis de tolerância das plantas ao produto.

Para a variável matéria seca o rabanete foi a espécie mais sensível, seguida do tomate e a espécie mais tolerante foi o pepino. Santos et al (2013) observaram que o tomate foi mais sensível que o pepino na produção de matéria seca quando na presença de resíduos de picloram no solo.

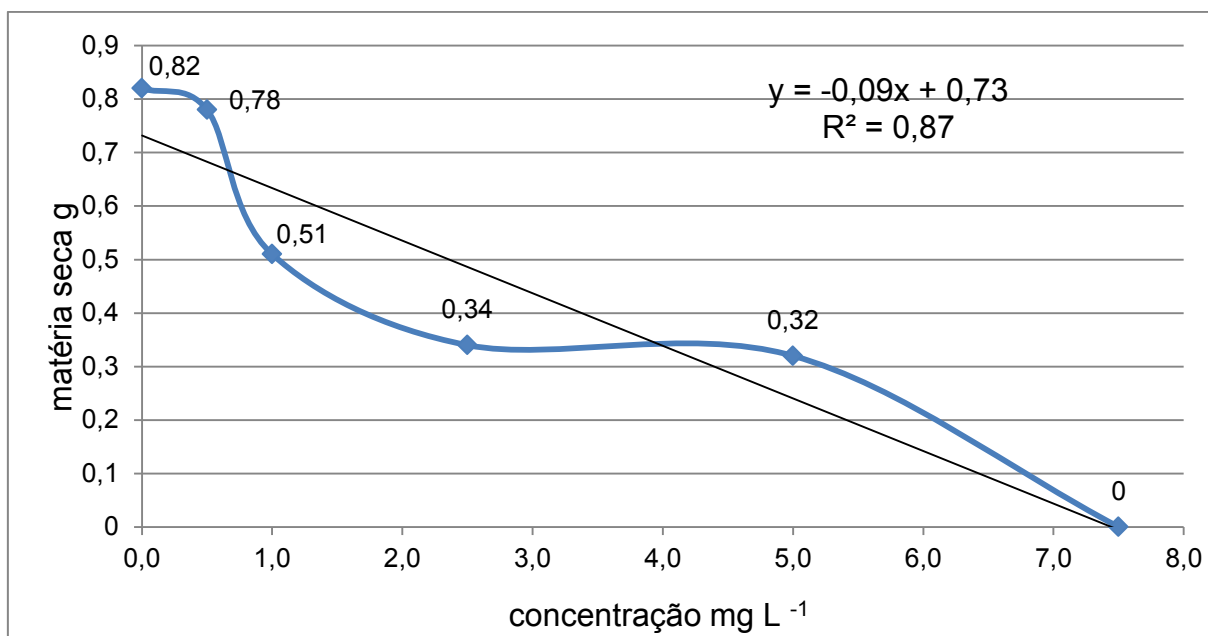


Figura 9. Curva de dose-resposta para matéria seca de plantas de *Solanum lycopersicum* em função das concentrações crescentes de triclopyr.

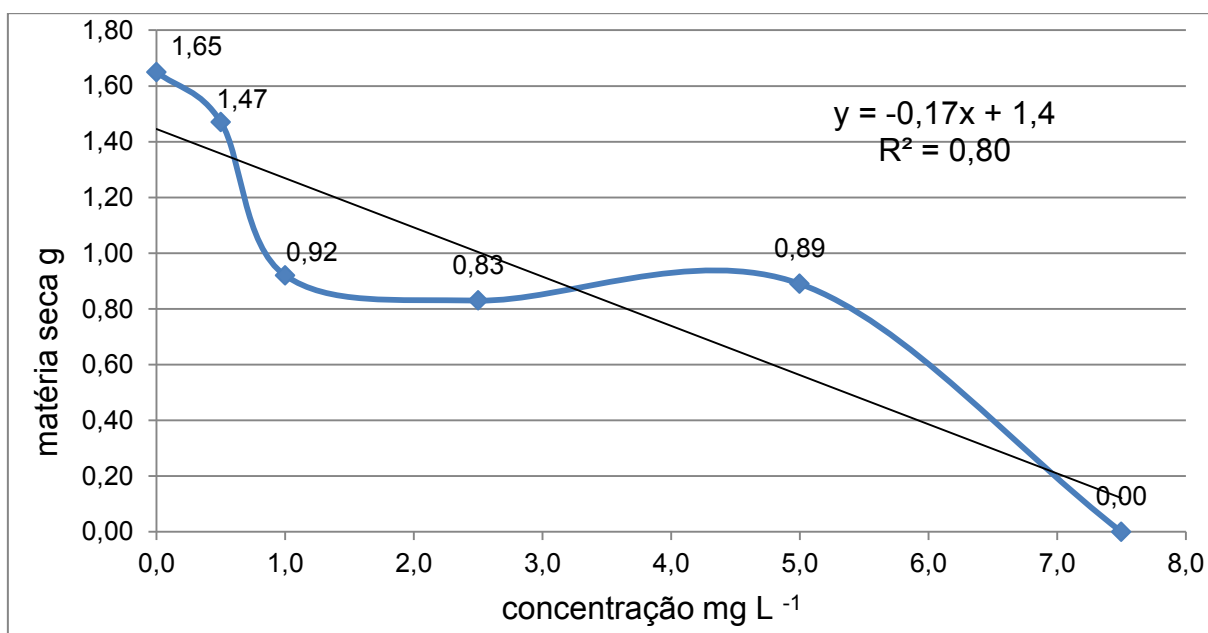


Figura 10. Curva de dose-resposta para matéria seca de plantas de *Cucumis sativus* em função das concentrações crescentes de triclopyr.

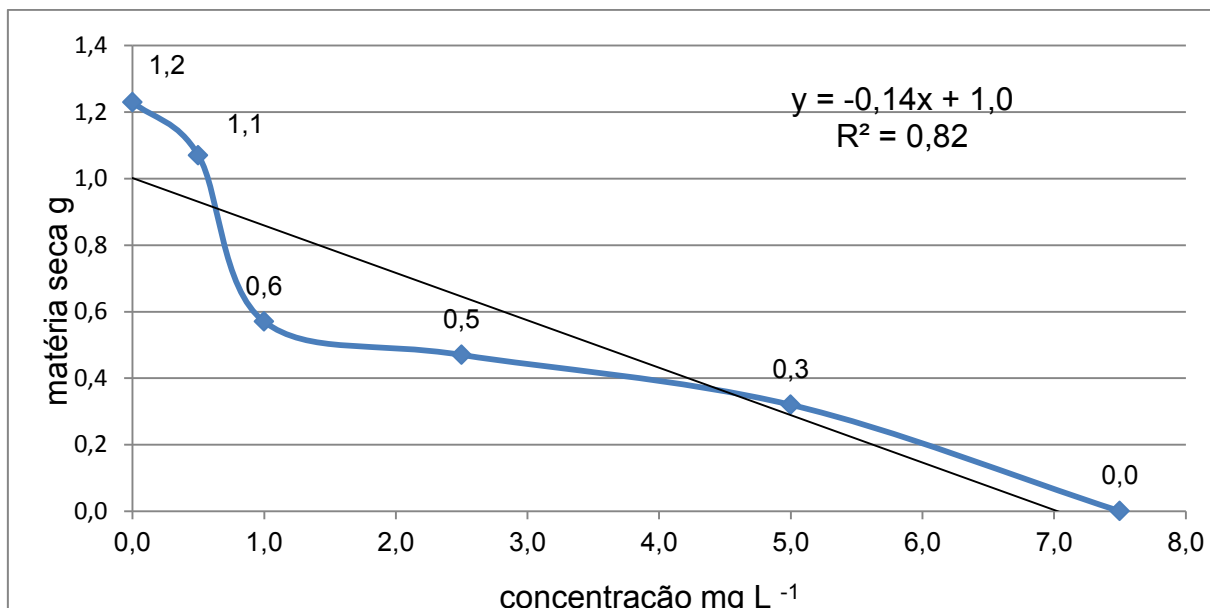


Figura 11. Curva de dose-resposta para matéria seca de plantas de *Raphanus sativus* em função das concentrações crescentes de triclopyr.

Para a altura de plantas todas as espécies apresentaram sensibilidade ao triclopyr, com o aumento das doses de triclopyr ocorreu redução para a altura das plantas. O tomate e o pepino apresentaram uma redução acentuada já na dose de 1,0 mg L⁻¹, sendo o pepino a espécie mais sensível. Santos et al (2013) observaram que o tomate foi à espécie mais sensível ao picloram quando comparado com pepino.

Resultados tem demonstrado a alta sensibilidade do pepino e tomate aos herbicidas auxínicos, levando a mudanças no seu metabolismo vegetal. Os compostos auxínicos atuam sobre o crescimento da planta, desorganizando-o, o que causou a redução na altura das plantas de tomate e pepino com o aumento das doses de 2,4D e picloram (NASCIMENTO; YAMASHITA, 2009).

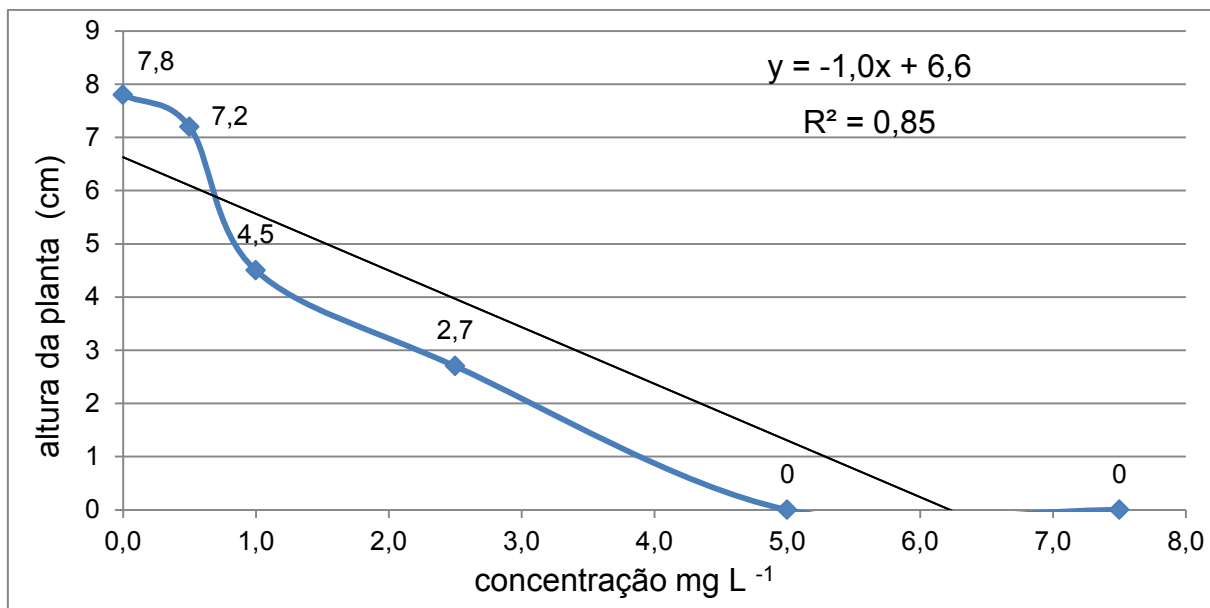


Figura 12. Curva de dose-resposta para altura das plantas de *Solanum Lycopersicum* em função das concentrações crescentes de triclopyr

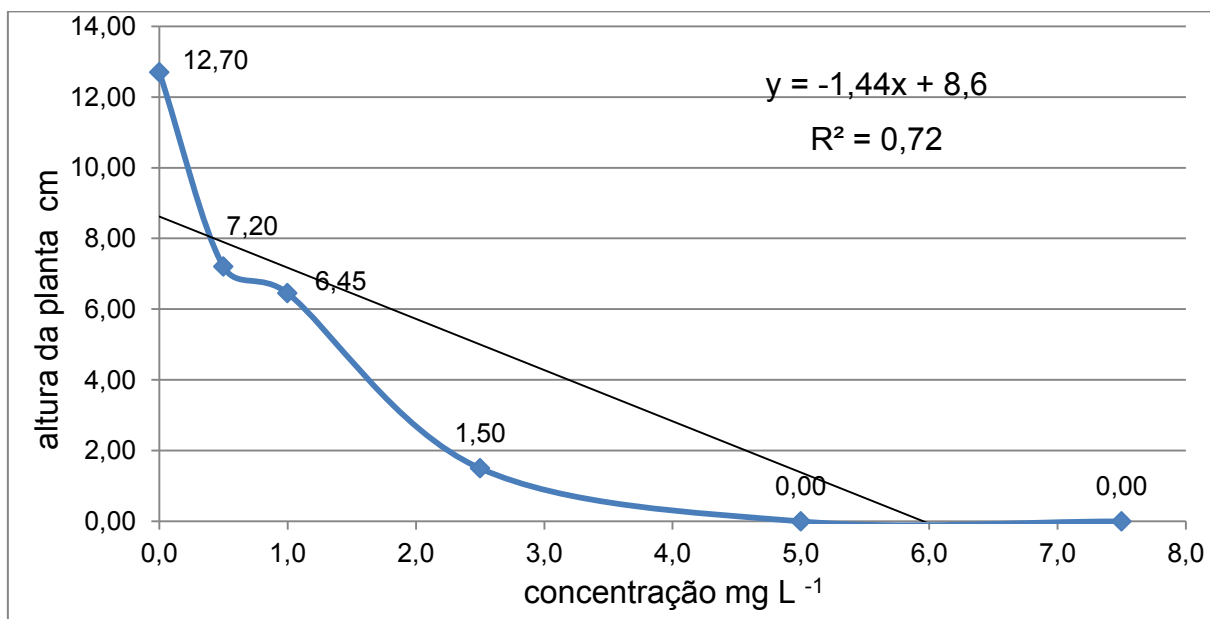


Figura 13. Curva de dose-resposta para altura das plantas de *Cucumis sativus* em função das concentrações crescentes de triclopyr.

O rabanete foi a espécie mais tolerante a presença do triclopyr no solo sendo que em 5,0 e 7,5 mg L⁻¹ a alturas das plantas foi de 0,9 e 0,0 g respectivamente,

quando comparado com o tomate e o pepino que na concentração de 5,0 mg L⁻¹, apresentaram altura das plantas igual a zero. (Figura 14).

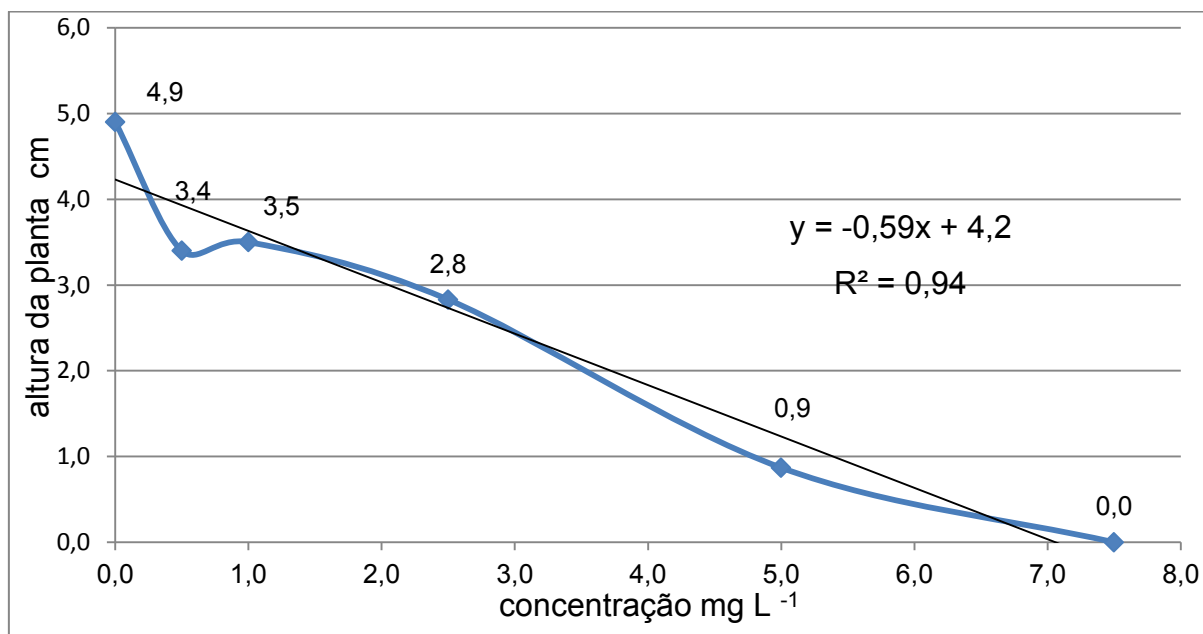


Figura 14. Curva de dose-resposta para altura das plantas de *Raphanus sativus* em função das concentrações crescentes de triclopyr.

As espécies testadas apresentaram elevada sensibilidade quando na presença do triclopyr. O pepino foi a espécie mais sensível apresentando redução de 50% da fitotoxicidade e da altura das plantas nas concentrações de 0,83 e 0,9 mg L⁻¹, respectivamente e a mais tolerante para a matéria seca onde seu I50% foi de 2,5 mg L⁻¹ (Tabela 20).

O pepino tem sido muito utilizado em bioensaios de resíduos em função da sensibilidade, mas a falta de correlação entre variação na produção de matéria seca e altura das plantas, para pequenas doses de herbicidas hormonais, tem dificultado o uso do pepino para estimar resíduos de auxinas (SANTOS et al. 2007).

O tomate apresentou sensibilidade intermediária quando comparado com o pepino e o rabanete, com redução de 50% da fitotoxicidade, da altura das plantas e da matéria seca nas concentrações de 0,93; 1,5 e 1,8 mg L⁻¹ (Tabela 20).

O rabanete para fitotoxicidade e altura das plantas apresentou redução de 50% nas concentrações de 2,5 e 2,4 mg L⁻¹, foi a espécie mais resistente e para a

variável matéria seca foi a espécie mais sensível apresentando um I50% de 1,0 mg L⁻¹ (Tabela 20).

Os efeitos nas variáveis analisadas foram crescentes, ou seja, com o aumento da dose observou-se a evolução dos sintomas de fitotoxicidade, redução da matéria seca e da altura das plantas para as espécies testadas. Entretanto a variável mais adequada para a determinação da presença do triclopyr no solo é a de fitotoxicidade, pois apresentou os menores valores de I50 (Tabela 20) para o tomate e o pepino, além dos sintomas visuais serem bem característicos da presença de herbicidas auxínicos no solo nas três espécies testadas.

Para a avaliação visual o tomate, o rabanete e o pepino apresentaram comportamento semelhante quando na presença do triclopyr a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹, com encarquilhamento, dobra das bordas com posteriores clorose e necrose das folhas, aumento de crescimento e após observou-se retorcimento do caule.

Tabela 20. Valores de I50 do triclopyr para *Cucumis sativus*, *Raphanus sativus* e *Solanum lycopersicum*.

Plantas indicadoras	Fitotoxicidade Nota (0-10)	Altura das plantas (cm)	Massa seca (g)
		I ₅₀ ¹ (mg L ⁻¹)	
<i>C. sativus</i>	0,83	0,9	2,5
<i>S. lycopersicum</i>	0,93	1,5	1,8
<i>R. sativus</i>	2,5	2,4	1,0

¹dose necessárias para proporcionar 50% de fitotoxicidade, redução de 50% na altura e da matéria seca (GERRA et al. 2011).

A utilização de plantas indicadoras da presença do triclopyr no solo, como o tomate, rabanete e pepino pode ser uma alternativa para a identificação de resíduos de herbicida no solo, pois os sintomas de fitotoxicidade visuais foram característicos e viáveis para pequenas concentrações deste herbicida no solo. O *C. sativus* é a espécie mais indicada para ser utilizadas como planta indicadora da presença de resíduos de triclopyr no solo, por apresentar sintomas de fitotoxicidade em baixas concentrações.

5. CONCLUSÕES

O triclopyr classifica-se como moderadamente tóxico para *Lemna minor*, *Azolla caroliniana* e *Pomacea canaliculata* e como altamente tóxico para *Hypessobrycon eques* e *Daphnia magna*, portanto são adequadas para serem utilizadas como organismos bioindicadores.

A *Daphnia magna* e *Hypessobrycon eques* são as espécies mais adequadas como bioindicadores para o monitoramento ambiental aquático do triclopyr.

O triclopyr é eficaz no controle de *Nymphaea* e *Myriophyllum aquaticum* em concentrações que não provoca a toxicidade no ambiente aquático e não é eficaz para o *Limnobium laevigatum* obtendo-se um controle favorável numa concentração maior que a recomenda.

As espécies *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum* e *Raphanus sativus* podem ser utilizadas como plantas indicadoras da presença do triclopyr no solo, pois apresentam sintomas característicos do herbicida em baixas concentrações no solo.

Para a identificação do resíduo de triclopyr no solo a avaliação da fitotoxicidade visual é a variável mais adequada, pois apresenta sintomas característicos bem evidentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. **Associação Brasileira de normas Técnicas**. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Métodos de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). São Paulo, p.23. 2009.

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. São Paulo, p.19, 2004.

ASSOCIACION LATINOAMERICANA DE MALEZAS. Recomendaciones sobre unificación de evaluación en ensayos de control de malezas. ALAM, Bogotá, v.1, n.1, p.35-48, 1974.

ANDRÉA, M.M. **Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos**. APTA, Centro de pesquisa e desenvolvimento de proteção ambiental, nº83, 2008.

ANDREI, E. (Ed.). **Compêndio de defensivos agrícolas: Guia prático de produtos fitossanitários**. 6ª. ed. São Paulo. 1999. 672p.

POOVEY, A. G, JEREMY G. SLADE AND MICHAEL D. NETHERLAND J. Susceptibility of Eurasian Watermilfoil (*Myriophyllum spicatum*) and a Milfoil Hybrid (*M. spicatum* × *M. sibiricum*) to Triclopyr and 2,4-D Amine. **J. Aquat. Plant Manage**, v.45, p. 111-115, 2007.

ARAUCO, L. R. R.; CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J. G. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. **Pest.: Rev. Ecotox. Meio Amb.**, v. 15, p. 55-64, 2005.

AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da Ecotoxicologia**. Editora Rima, São Paulo, São Carlos, 2003, 340p.

BAUN, A.; KLOEFT, L.; BJERG, P.L. & NYHOLM, N. Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with land fill leached. **Environ. Toxicol. and Chem.**, v. 18, n. 9, p. 2046-2053, 1999.

BEYER, E. M.; DUFFY, M. J.; HAY, J. V.; SCHLUETER, D. D. Sulfunylureia. In: KEARNEY, P. C.; KAUFMAN, D.D. (eds.). **Herbicides: chemistry, degradation and mode of action**. New York: M. Dekker, 1988. p.117-189.

BITTENCOURT, E. Embrapa comprova prejuízos aos recursos hídricos por defensivos e pesquisa opções de menor impacto no meio ambiente, 2004. Disponível em: <[http://www.agenciarrural.go.gov.br/not agrotoxicos.htm](http://www.agenciarrural.go.gov.br/not/agrotoxicos.htm)>. Acesso em janeiro, 2012.

BOOCK, M.V; MACHADO-NETO, J.G. Estudos toxicológicos do oxicloreto de cobre para tilápia vermelha (*Oreochromis sp.*). **Arq. Inst. Biol.**, v. 67, p. 215-221, 2000.

BRIGANTE, J; ESPÍNDOLA, E. L. G. **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima, 2003. 255p.

CAIRNS, J. JR.; NIEDERLEHNER, B. R. **Ecological Toxicity testind**. Lewis Publishers, Boca Raton, USA, p. 228, 1995.

CARDOSO, L. R. et al. Sensibilidade a herbicidas de acessos de aguapé coletados em reservatórios do Estado de São Paulo. **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 61-67, 2003.

CASSIDY, J. S. **Avaliação da qualidade da água do rio Cértima através de ensaios ecotoxicológicos**. 2010. Dissertação (Mestre em Engenharia do Ambiente) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010. 90 p.

COSTA, N.V.; MARTINS, D.; RODELLA, R.A. & COSTA, L.D.N.C. pH foliar e deposição de gotas de pulverização em plantas daninhas aquáticas: *Brachiaria mutica*, *Brachiaria subquadripata* e *Panicum repens*. **Planta Daninha**, v.23, p. 295-304, 2005.

Esteves, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Interciência/Finep, p. 602 , 1998.

EXTONET. <http://extoxnet.orst.edu/pips/triclopy>, 2002. acesso em 18 julho 2012

FRELLO, C.P. **Avaliação da toxicidade aguda do pesticida carbofuran utilizando reativos biológicos *Poecilia reticulata* e *Daphnia magna***. Florianópolis, 1998. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

FLINT, J. L E WITT, W. W. Microbial Degradation of Imazaquin and Imazethapyr. **Weed Science**, v. 45, nº, 4, p.586-591, 1997.

GIANCOTTI, P.R. F.; YAMAUTI, M. S.; BARRASO, A.A. M.; PARREIRA, M.C.; ALVES, P.C.A. Controle e características germinativa de *Synedrellois grisebachii* com herbicidas pós-emergentes. **XXVII Congresso Brasileiro da Ciências das Plantas Daninhas**, Centro de Convenções – Ribeirão Preto – SP, p. 2055-1059, 2010.

GOKTEPE, I.; PORTIER, R. AHMEDNA, M. Ecological Risk Assessment of Neem-Based Pesticides, J. Environ. Scien. Health, Part B: **Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 39, n.2, p.311-320, 2004.

GUERRA, N; JÚNIOR OLIVEIRA, R. S; CONSTANTIN, J; NETO, A. M.O; DAN, H. A; ALONSO, D. G; JUMES T. M. C. D. Seleção de espécies bioindicadoras para os herbicidas trifloxysulfuron-sodium e pyriithiobac-sodium. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.10, n.1, p.37-48, 2011.

HAMILTON, M.A. et al. Trimmed spearman-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology**, Iowa, v. 7, p. 714-719, 1977.

HELFRICH, L.A.; WEIGMANN, D.L.; HIPKINS, P.; STINSON, E.R. **Pesticides and aquatic animals**: aguide to reducing impacts on aquatic systems. 1996.

HERRICKS, E. Princípios gerais de toxicologia. In: MATSUI, S.; BARRETT, B. F. D.; BANERJEE, J. Gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios. (Série Diretrizes para o gerenciamento de lagos). **São Carlos: ILEC -IIIE**. v. 4, p. 9 – 30, 2002.

HOFSTRA, D. E.; CHAMPION, P. D.; DUGDALE, T. M. Herbicide trials for the control of parrotsfeather. **Journal of Aquatic Plant Management**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2006.

IGNÁCIO, N. F. **Seleção de bioindicadores aquáticos pela toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida fipronil**. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da FCAV/UNESP (CAUNESP), Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2014.

INOUE, M.H. et al. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.312-323, 2003.

JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N. Toxicidade aguda do herbicida clomazone no peixe *Hyphessobrycon scholzei*: avaliação da concentração letal mediana e de alterações no conteúdo de nutrientes. **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v. 8, p.101-110, 1998.

JOHNSON, W. G., T. L. LAVY, AND E. E. GBUR. Sorption, mobility, and degradation of triclopyr and 2,4-D on four soils. **Weed Science**, v.43, p. 678-684, 1995.

KISSMANN, K. G. Resistência de plantas daninhas a herbicidas, 2003. Disponível: http://www.hrac-br.com.br/arquivo/texto_resistencia_herbicidas.doc.

KOKTA, C.; ROTHERT, H. A. **Hazard and risk assessment scheme for evaluating effects on earthworms: the approach in the Federal Republic of Germany**. In: GREIG-SMITH, P. W.; BECKER, H.; EDWARDS, P. J.; HEIMBACH, F. (Eds.) *Ecotoxicology of earthworm*, p.169 – 176, 1992.

KURT D. GETSINGER, SUSAN L. SPRECHER, A. P. SMAGULA. Effects of Triclopyr on Variable-Leaf Watermilfoil. **Journal Aquatic Plant Management**, v.41, p. 124-126, 2003.

KREUTZWEISER, D. P., S. B. HOLMES, AND D. C. EICHENBERG. Influence of exposure duration on the toxicity of triclopyr ester to fish and aquatic insects. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 26, p.124-129, 1994.

LANDOLT, E; KANDELER, R. **The family of Lemnaceae – a monographic study: phytochemistry, physiology, application, bibliography. Biosystematic investigation the family of duckweeds**. Stiftung Rubel: Veröffentlichungendes Geobotanischen Institutes der ETH, Zurich, v.4, 638 p., 1987.

LEWER, P. AND W.J. OWEN. Selective action of the herbicide triclopyr. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 36, p. 187-200, 1990.

LOUX, M. M E REESE, W. T. Effect of Soil type and pH on Persistence and Carryover of Imidazolinone Herbicides. **Weed Technology**, v. 7, n. 2, p. 452-458, 1993.

LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M. **Comportamento ambiental de agrotóxicos. Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.33-35, 2000, Suplemento Julho.

LUMPKIN, T. A.; PLUCKNEET, D. L. Azolla: botany, physiology and use as green manure. **Society for Economic Botany**, v. 34, p. 111-113, 1980.

LUNA, A.J; SALES, L. T.; SILVA, R.F. Agrotóxicos: responsabilidade de todos (Uma abordagem da questão dentro do paradigma do desenvolvimento sustentável), 2004 Disponível em <http://www.prt6.gov.br/forum/downloads/Artigo1_Adeilson.doc> Acesso em janeiro de 2012.

MANN, R. M.; BIDWELL, R. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 193-199, 1999.

MARCHI, S. R. et al. Efeito de pontas de pulverização e de arranjos populacionais de plantas de *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata* na deposição de calda de pulverização sobre plantas de *Pistia stratiotes*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 389-396, 2009.

MARCONDES, D. A. S.; TANAKA, R. H. Plantas aquáticas nos reservatórios das usinas hidrelétricas da CESP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 21. WORKSHOP DE PLANTAS AQUÁTICAS. 1997, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 1997. p. 2-4.

MARTINS, D. et al. Controle químico de *Pistia stratiotes*, *Eichhornia crassipes* e *Salvinia molesta* em caixas d'água. **Planta Daninha**, v. 20, p. 83-88, 2002. (Edição Especial).

MARTIN, P. R., ESTEBENET, A. L. Interpopulation variation in life-history traits of *Pomacea canaliculata* (*Gastropoda: Ampullariidae*) in southwestern Buenos Aires Province, Argentina. **Malacol.**, v. 44, p.153-163, 2002.

MCCALL, P. J e P. D. GAVIT. Aqueous photolysis of triclopyr and its butoxyethyl ester and calculated environmental photodecomposition rates. **Environmental Toxicity Chemistry**, v. 5, p. 879-885, 1986.

MELO, C.A.D. MEDEIROS, et al. Efeito residual de sulfentrazone, isoxaflutole e oxyfluorfen em três solos. **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 835-842, 2010.

MITCHELL, S. E., HALVES, J., LAMPERT, W. Coexistence of similar genotypes of *Daphnia magna* in intermittent populations: response to thermal stress. **Oikos**, v. 106, n. 3, p. 469–478, 2004.

MUSTAFÁ, A. L. et al. A experiência da CESP no manejo e controle de macrófitas no reservatório da UHE Souza Dias (Jupiá). **Ação Ambiental** v. 13, n. 43, p. 17-26, 2010.

NASCIMENTO, E. R; YAMASHITA, O. M. Desenvolvimento inicial de olerícolas cultivadas em solos contaminados com resíduos de 2,4d + picloram. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n.1, p 47-54, 2009.

NEWTON, M., F. ROBERTS, A. ALLEN, B. KELPSAS, D. WHITE, AND P. BOYD. Deposition and dissipation of three herbicides in foliage, litter, and soil of brushfields of southwest Oregon. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.38, p.574-583, 1990.

Norris, L., M. L. Montgomery, and L. E. Warren. Triclopyr persistence in western Oregon hill pastures. Bull. **Environment Contamination of Toxicology**. v.39, p.134-141, 1987.

NUNES, A. L.; VIDAL, R. A. Seleção de plantas quantificadoras de herbicidas residuais. Pesticidas: **Revista ecotoxicologica e meio ambiente**, Curitiba, v.19, p.19-28, 2009.

NYFFELER, A. et al. Collaborative studies of dose response curve obtained with different bioassay method for soil-applied herbicides. **Weed Research**, v.22, p. 213-222, 1982.

OECD. **Organization for Economic Cooperation and Development**. Guidelines for the Testing of Chemicals, *Lemna sp.* Growth inhibition test. Paris, France, p.22, 2002.

PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60, p. 1010-1016, 1982.

PITELLI, R. L. C. M. et al. Dinâmica da comunidade de macrófitas aquáticas no reservatório de Santana, RJ. **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 473-480, 2008.

RAND, G.M & PETROCELLI, S.R. In: G.M Rand & S.R. Petrocelli, (eds). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere, New York, p.65, 1985.

REYNOLDS, B. Invasive alien plant species of Virginia. Course requirements at Virginia Polytechnic Institute & State University, 1999.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. Guia de herbicidas. Londrina: Edição dos Autores, p.675, 1998.

SANTOS, D.M M. DOS; PITELLI, R.A.; BANZATTO, D. A.; **Influência de herbicidas em macrófitas aquáticas**. Jaboticabal. Ed. FUNEP, p.8, 2001.

SANTOS, M.V.; FREITAS, F. C. L.; FERREIRA, F. A. VIANA, R. G.; TUFFI SANTOS, L. D. FONSECA, D.M. Eficácia e persistência no solo de herbicidas utilizados em pastagem. **Plantas Daninhas**, Viçosa, MG, v.24, n.2, p. 391-398, 2006.

SANTOS, R.T; OLIVEIRA, Y.S; VIANA, R.G; COSTA, Y.K.S; AZEVEDO, K.G.S ; EVANGELISTA, D.V.P. EFEITO RESIDUAL DE HERBICIDAS MIMETIZADORES DE AUXINA EM SOLOS PROVENIENTES DE PASTAGENS DO MUNICÍPIO DE PARAUAPEBAS-PA. **XXVIII Congresso Brasileiro da Ciência das plantas daninhas na ERA da Biotecnologia**, Campo Grande, 2012.

SANTOS, D. P; BRAGA, R. R; GUIMARÃES, A.R; PASSOS, A.B. R. J; SILVA, D. V; SANTOS, J. B; NERY, M.C. Determinação de espécies bioindicadores de resíduos de herbicidas auxínicos. **Revista Ceres**, v.60, n.3, p. 354-362, 2013.

SILVA, M. M. S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF p. 480, 2004.

SILVA, A. A., SANTOS, J. **Herbicidas: classificação e mecanismo de ação**. Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa: Ed. UFV, Cap.3, p. 83-148, 2007.

SMITH, A. E. The hydrolysis of herbicidal phenoxyalkanoic esters of phenoxyalkanoic acids in Saskatchewan soils. **Weed Research**. v.16, p.19-22, 1976.

SOLOMOM, K. R. Avaliação de riscos ecotoxicológicos dos produtos fitossanitários. **Relatório técnico**. Centro de Toxicologia. Universidade de Guelph, Canadá. 1996. 52p.

SOUZA, A. P. et al. Lixiviação do glyphosate e do imazapyr em solos com diferentes texturas e composição química. II Método analítico. **Plantas daninhas**, v. 17, n. 2, p. 245-262, 1999.

SPADOTTO, C.A; GOMES, M.A.F; LUCHINI, L.C; ANDRÉA, M.M. **Monitoramento do risco ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações**. Embrapa Meio Ambiente (Documento 42), 2004. 1ªed. 29p.

STEPHENSON, G. R., K. R. Solomon, C. S. Bowhey, and K. Liber. Persistence, leachability, and lateral movement of triclopyr (Garlon) in selected Canadian forestry soils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.38, p.584-588, 1990.

STUTZER, G.; GUIMARÃES, G. **Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários**. Viçosa: UFV, p. 69-84, 2003.

THILL, D. Growth regulator herbicides. In: WELLER, S. C. et al. Herbicide action course. West Lafayette: Purdue University, 2003. p. 267-275.

THOMAZ, S.M. Fatores ecológicos associados à colonização e ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas e desafios de manejo. **Plantas Daninhas**, v.20, p. 21-33, 2002 (Edição Especial)

THOMPSON, D. G., B. STAZNIK, D. D. FONTAINE, T. MACKAY, G. R. OLIVER, AND J. L. TROTH. Fate of triclopyr ester (Release®) in a boreal forest stream. **Environmental Toxicity Chemistry**, v.10, p. 619-632, 1991.

TU, R. HURD, C. ROBINSON, R E RANDALL, J.M. Triclopyr. **Weed Control Methods Handbook**, The Nature Conservancy, 2001.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v1, p. 151-173, 1977.

URBAN, D. J; COOK, N. J. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure Ecological risk assessment. Washington. 1986. 96p. (USEPA Publication EPA/540/09-88-035).

USEPA. **Proposed guidelines for ecological risk assessment**. Washington, D C. Risk Assessment Forum (EPA 630-R95-002B), 1987.

USEPA. Environmental Protection Agency. New Pesticide Fact Sheet. PB96-181516.EPA737-F-96-005. U.S.EPA. **Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances**, p1-10, 1996.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Prevention, Pesticide and Toxic Substances** (EPA-738-F-98-007), 1998.

VELINI, E. D. et al. Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos, com herbicidas. Londrina: **Plantas Daninhas**, p.42, 1995.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Paulo, São Carlos. p.486, 2008.

ZUCKER, E. **Hazard evaluation division: standard evaluation procedure: acute toxicity test for freshwater fish**. Washington, D.C., 1985. (USEPA publication 540/9-85-006). Disponível em: <www.epa.gov>. Acesso em: janeiro de 2014.

Wong, P. K. Effects of 2,4 D, glyphosate and paraquat on growth photosynthesis and chlorophyll a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. **Chemosphere, Oxford**, v.41, n.1-2, p.177-182, 2000.

WSSA. 1994. **Herbicide Handbook. Weed Society of America.** Champaign, Illinois, 352 p.