

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE ECOTOXICOLÓGICO
COM O FUNGO *Alternaria cassiae*: TOXICIDADE AGUDA
DE AGROTÓXICOS E AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL**

Aritana Gil Basile

Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE ECOTOXICOLÓGICO
COM O FUNGO *Alternaria cassiae*: TOXICIDADE AGUDA
DE AGROTÓXICOS E AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL**

Aritana Gil Basile

Orientador: Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli

Co-Orientador: Prof. Dr. Claudinei da Cruz

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia “Produção Vegetal”.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2008

Basile, Aritana Gil
B275d Desenvolvimento de teste Ecotoxicológico com o fungo *Alternaria cassiae*: Toxicidade aguda de agrotóxicos e avaliação de risco ambiental / Aritana Gil Basile. -- Jaboticabal, 2008
vi , 54 f. : il., 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Robinson Antonio Pitelli
Co-orientador: Claudinei da Cruz
Banca examinadora: Joaquim Gonçalves Machado Neto, Pedro Antonio Zagatto
Bibliografia

1. Microorganismo. 2. Xenobióticos. 3. Ambiente terrestre. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.95:504

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

ARITANA GIL BASILE – nascido na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, no ano de 1981, é engenheiro agrônomo graduado pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal – junto à LV turma de Engenheiros Agrônomos (2005). Durante a graduação, desenvolveu projetos nas áreas de matologia (biologia e controle de plantas daninhas), que deram suporte a sua monografia intitulada “Influência do espaçamento de semeadura de milho na comunidade infestante e nos componentes produtivos da cultura”, Bolsista de Iniciação Científica pelo Programa PIBIC/CNPq (2004/05), Membro da Gestão (2003/04) do Diretório Acadêmico “Fernando Costa” e representante discente do Conselho de Curso de Graduação em Agronomia. Ingressou no curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia “Produção Vegetal”, nessa mesma instituição, no ano de 2006. Atualmente, atua nas áreas matologia e ecotoxicologia, desenvolvendo projetos de eficácia e seletividade de produtos fitossanitários e, especialmente, testes ecotoxicológicos com organismos do ambiente terrestre, que foi o tema de sua dissertação.

*"Produtos fitossanitários devem ser usados com a precisão de um bisturi,
não como uma foice".*

Dedico este trabalho...

À Newton e Bibiana, meus pais, que com muita luta, dedicação e amor, me deram a educação sem a qual eu não teria chegado a lugar algum. Vocês dois são motivo de muito orgulho e admiração para mim.

À minha irmã Daniele, eterna guerreira, motivo de orgulho e alegrias. Você é fundamental na minha vida.

À minha namorada Daniela, companheira incansável. Você é a fonte de inspiração de tudo o que faço, com sua inteligência, carinho e alegria enche minha vida de realizações. Sei que ao seu lado o amanhã será sempre melhor do que hoje.

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e entusiasmo a mim concedidos na realização deste trabalho e por me guiar e abençoar todos os meus passos.

A minha família que sempre esteve ao meu lado, mesmo quando afastados pela distancia física. Prova de amor e união.

Ao meu orientador Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli por me acompanhar nesta caminhada, me indicando sempre o melhor caminho, com muita sabedoria.

Ao meu co-orientador e amigo Claudinei da Cruz, modelo de pesquisador e de ser humano, pela sua paciência e inestimável ajuda, sem a qual este trabalho não seria possível.

A Banca examinadora, Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto e Prof. Dr. Pedro Antonio Zagatto pelas observações e sugestões que acrescentaram muito à este trabalho.

Aos Funcionários do NEPEAM, Sr. Aguinaldo, Alessandro e Ronaldo.

A todos os integrantes do NEPEAM, que foram minha família durante o período desta pesquisa, pessoas que sentirei saudades e que farão parte de minha vida e lembranças sempre.

A todos os moradores, ex-moradores e agregados da república Pau da Goiaba, meu segundo lar. Aprendi muito no dia-a-dia desta casa. Tempo que não volta, simplesmente inesquecível.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP por me proporcionar mais esta realização.

Ao Departamento de Fitossanidade e, todos seus funcionários, pelo apoio nas horas de mais necessidade.

Ao CNPq, processo MS/CNPq 131410/2006-7, pelo apoio financeiro e por ter apoiado e acreditado nesta pesquisa.

Meu muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	
Introdução	01
Objetivos	03
Referências Bibliográficas	04
 CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO FUNGO <i>Alternaria cassiae</i> COMO ORGANISMO-TESTE PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	
Resumo	06
Summary	07
Introdução	08
Material e Métodos	09
Obtenção do fungo	09
Método de cultivo	10
Avaliação da sensibilidade do fungo à substância referência	11
Resultados e Discussão	13
Conclusão	18
Referências Bibliográficas	19
 CAPÍTULO 3 - TOXICIDADE AGUDA E CLASSIFICAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DE HERBICIDAS PARA O FUNGO <i>Alternaria cassiae</i>	
Resumo	22
Summary	23
Introdução	24
Material e Métodos	25
Obtenção do fungo	25
Método de cultivo	25
Seleção dos herbicidas	26
Toxicidade dos herbicidas para o fungo <i>Alternaria cassiae</i>	27

Resultados e Discussão	29
Conclusão	36
Referências Bibliográficas	37

CAPÍTULO 4 - TOXICIDADE AGUDA E CLASSIFICAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DE FUNGICIDAS PARA O FUNGO *Alternaria cassiae*

Resumo	39
Summary	40
Introdução	41
Material e Métodos	42
Obtenção do fungo	42
Método de cultivo	42
Seleção dos fungicidas	43
Toxicidade dos fungicidas para o fungo <i>Alternaria cassiae</i>	43
Resultados e Discussão	46
Conclusão	51
Referências Bibliográficas	52

ANEXO 1

Carta Controle	54
----------------------	----

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO FUNGO *Alternaria cassiae* COMO ORGANISMO-TESTE PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

Tabela 1. Concentração Efetiva 50% (CE (I)50;7d), limite superior, limite inferior e coeficiente de variação do dicromato de potássio para o fungo <i>Alternaria cassiae</i>	14
Tabela 2. Porcentagem média de inibição (%) no crescimento radial do fungo <i>Alternaria cassiae</i> nos sete testes de toxicidade aguda com o dicromato potássio.	18

CAPÍTULO 3 - TOXICIDADE AGUDA E CLASSIFICAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DE HERBICIDAS PARA O FUNGO *Alternaria cassiae*

Tabela 1. Ingredientes ativo, concentrações, formulações, modo de ação e classe toxicológicos herbicidas utilizados nos estudos ecotoxicológicos.	26
Tabela 2. Concentrações utilizadas nos testes definitivos para a determinação da toxicidade aguda dos herbicidas.	27
Tabela 3. Classificação da toxicidade aguda para organismos terrestres; adaptado de Roberts & Dorough, (1984).	29
Tabela 4. Média da concentração efetiva 50% e do limite superior e inferior dos herbicidas.	30
Tabela 5. Análise do risco ambiental dos herbicidas para o fungo <i>Alternaria cassiae</i>	35

CAPÍTULO 4 - TOXICIDADE AGUDA E CLASSIFICAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DE FUNGICIDAS PARA O FUNGO *Alternaria cassiae*

Tabela 1. Classificação da toxicidade aguda para organismos terrestres; adaptado de Roberts & Dorrough, (1984)	45
Tabela 2. Média da concentração efetiva 50% (EC (I)50;7d), do limite superior e inferior dos fungicidas.	46
Tabela 3. Análise do risco ambiental dos fungicidas para o fungo <i>Alternaria cassiae</i>	51

ANEXO 1

Tabela 1. Concentração Efetiva 50% (CE (I)50;7d), limite superior, limite inferior e coeficiente de variação do dicromato de potássio para o fungo <i>Alternaria cassiae</i>	54
--	----

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO FUNGO *Alternaria cassiae* COMO ORGANISMO-TESTE PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

- Figura 1.** Fotografia dos tubos de ensaio contendo a colônia-estoque do fungo *Alternaria cassiae* armazenada na micoteca do NEPEAM, Unesp, Jaboticabal. 10
- Figura 2.** Fotografias da metodologia utilizada: (A) Meios prontos para serem auto-clavados; (B) Solução Estoque; (C) Soluções de diluição; (D) Introdução do DCP no meio de cultura; (E) Meio sendo vertido na placa de Petri; (F) Disco do fungo sendo repicado; (G) Detalhe da colônia de *Alternaria cassiae*; (H) Avaliação do crescimento da colônia fúngica. 12
- Figura 3.** Diâmetros de colônias de *Alternaria cassiae* crescendo em meio com diferentes concentrações da DCP, após sete dias de incubação no teste preliminar. 14
- Figura 4.** Curvas de dose resposta linear e quadrática da inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* com o aumento da concentração de dicromato de potássio. 16
- Figura 5.** Curva de dose resposta sigmoidal da inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* com o aumento da concentração de dicromato de potássio. 17

CAPÍTULO 3 - TOXICIDADE AGUDA E CLASSIFICAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DE HERBICIDAS PARA O FUNGO *Alternaria cassiae*

- Figura 1.** Fotografias do fungo *Alternaria cassiae* expostos a herbicidas: (A) Resposta de inibição do crescimento ao final do teste de toxicidade para trifluralin; (B) inibição do crescimento na concentração de 25,0 mg.L⁻¹ para fluazifop-p-butyl; (C) inibição do crescimento na concentração de 2000,0 mg.L⁻¹ para 2,4-D amina. 31
- Figura 2.** Curva sigmoidal da relação concentração-efeito da inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para os herbicidas considerados menos tóxicos. 32
- Figura 3.** Curva sigmoidal de concentração-efeito da inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para os herbicidas considerados medianamente tóxicos. 33
- Figura 4.** Curva sigmoidal de concentração-efeito da inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para os herbicidas considerados tóxicos. 34

CAPÍTULO 4 - TOXICIDADE AGUDA E CLASSIFICAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DE FUNGICIDAS PARA O FUNGO *Alternaria cassiae*

- Figura 1.** Fotografias do fungo *Alternaria cassiae* expostos aos fungicidas: (A) Resposta de inibição do crescimento ao final do teste de toxicidade para captana; (B) inibição do crescimento na concentração de 10,0 mg.L⁻¹ de tebuconazol; (C) inibição do crescimento na concentração de 50,0 mg.L⁻¹ de clorotalonil + cloridrato de propamocarbe. 47
- Figura 2.** Curva sigmoidal da relação concentração-efeito na inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para o fungicida captana. 48
- Figura 3.** Curva sigmoidal da relação concentração-efeito na inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para o fungicida tebuconazol. 49

Figura 4. Curva sigmoidal da relação concentração-efeito na inibição de crescimento do fungo <i>Alternaria cassiae</i> para a mistura dos fungicidas clorotalonil + cloridrato de propanocarbe.	50
---	----

ANEXO 1

Figura 1. Controle da sensibilidade do fungo <i>Alternaria cassiae</i> à substância de referência dicromato de potássio.	54
--	----

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial intensificou a procura por bens de consumo, espaço, tecnologia e, principalmente, alimentos. Esta pressão sobre a produção industrial e agrícola resultou em uma crescente redução da diversidade biológica, uso de substâncias químicas sintéticas, geração de resíduos e outros problemas ambientais. Atualmente, os órgãos reguladores também intensificam as exigências de dados que permitam inferir sobre o risco ambiental de substâncias a serem utilizadas na agricultura, na saúde, no processamento e conservação de alimentos, e outros produtos, inclusive resíduos dos processos produtivos. Uma série de informação dos compostos químicos é conseguida pelos testes ecotoxicológicos.

A Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais terrestres ou aquáticos (Plaa, 1982; Cairns & Niederlehner, 1995). O conhecimento Ecotoxicológico é multidisciplinar e congrega conhecimentos da Ecologia, Fisiologia, Etologia e da Toxicologia clássica. Os dados Ecotoxicológicos têm sido utilizados como uma excelente ferramenta para indicar e prever os possíveis efeitos morfo-funcionais, deletérios, a toxicidade e o impacto causado pelos produtos químicos.

Por meio da Ecotoxicologia pode-se avaliar os danos ocorridos nos diversos ecossistemas após a contaminação e também prever impactos futuros, quando da comercialização de produtos químicos e/ou lançamentos de despejos num determinado ambiente (Zagatto & Bertoletti, 2008).

Os procedimentos para execução de ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos são bem estabelecidos e descritos em normas técnicas brasileiras da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - SP (CETESB), e métodos descritos no Manual de Testes para Avaliação da ecotoxicidade de Agentes Químicos, organizado pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Sisinno *et al.*, 2004).

Entretanto, os ensaios para avaliação da ecotoxicidade com organismos de solo ainda não estão bem estabelecidos no Brasil.

Vários organismos do solo podem ser utilizados para estudos ecotoxicológicos, desde que atendam aos quesitos apresentados por Rand & Petrocelli (1985). Assim, os fungos podem ser opções viáveis e de baixo custo operacional nestas avaliações. Os fungos constituem-se de vegetais inferiores de grande importância e representatividade na dinâmica dos nutrientes e da energia no solo. A relação entre fungos e bactérias na biomassa microbiana de diferentes tipos de solos varia entre 63% e 82% para fungos e entre 18 e 37% para bactérias (Ananyeva *et al.*, 2006).

Embora a grande maioria dos microrganismos do solo ainda seja desconhecida e não seja passível de cultivo em condições de laboratório, para serem empregados em estudos ecotoxicológicos, algumas espécies exercem funções ambientais bem conhecidas e de relevante importância para o ambiente edáfico. Um exemplo é o fungo *Alternaria cassiae*.

O gênero *Alternaria* spp. congrega fungos imperfeitos inseridos na família Dematiaceae, ordem Hyphomycetes, que produz conídios referidos como dictyosporos (Rotem, 1994). *Alternaria cassiae* possui ampla distribuição geográfica na região tropical e subtropical do globo terrestre, sendo citado na Ásia (Jurair & Khan, 1960), América do Norte (Walker & Boyette, 1982) e América do Sul (Figueiredo *et al.*, 1992). Este fungo é de fácil produção em laboratório (Ávila *et al.*, 2000) e tem destacada importância na dinâmica dos agroecossistemas, especialmente no controle biológico natural da *Senna obtusifolia* (L.) em condições de plantio direto (Pitelli *et al.*, 1998). *A. cassiae* constitui um promissor agente de controle biológico de *S. obtusifolia* e candidato adequado para utilização na estratégia inundativa, como bioherbicida. Em estudos de campo foram constatados resultados promissores do uso agrícola deste organismo (Charudattan, 1986; Pitelli *et al.*, 1993, 1994 e 1998;).

Assim, o fungo *A. cassiae* apresenta grande parte dos quesitos de eleição de um organismo-teste em testes ecotoxicológicos, onde destacam-se: crescimento radial rápido e uniforme, fácil obtenção e cultivo; e nas avaliações de crescimento, facilidade de avaliação pelo fato do fungo ter coloração escura. Trata-se de um organismo útil, tem grande importância na dinâmica dos agroecossistemas, especialmente no plantio

direto que é o sistema de cultivo predominante de culturas anuais no Brasil e é considerado um grande passo para a sustentabilidade da agricultura de grãos (Pitelli & Durigan, 2001).

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Estudar a viabilidade da utilização do fungo *Alternaria cassiae* como organismo-teste para testes ecotoxicológicos para o ambiente terrestre;
- 2) Avaliar a sensibilidade do fungo *A. cassiae* ao dicromato de potássio para a validação deste composto como substância de referência em testes ecotoxicológicos com *A. cassiae*;
- 3) Determinar a toxicidade aguda e avaliar o risco ambiental de doze formulações de herbicidas (amicarbazone, amônio-glufosinato, clomazone, 2,4-D amina, fluazifop-p-butyl, glyphosate, imazethapyr, MSMA, oxyfluorfen, paraquat, s-metolachlor e trifluralin) para o fungo *A. cassiae*.
- 4) Determinar a toxicidade aguda e avaliar o risco ambiental dos fungicidas captana, tebuconazol, clorotalonil + cloridrato de propamocarbe para o fungo *A. cassiae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, Z. R., MELLO, S. C. M., RIBEIRO, Z. M. A. & FONTES, E. M. G., Produção de inoculo de *Alternaria cassiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, 2000, 533-541.
- ANANYEVA, N.D., SUSYAN, E.A., CHERNOVA, O.V., CHERNOV, I.Yu. & MAKAROVA, O.L., The ratio of fungi and bacteria in the biomass of different types of soil determined by selective inhibition. *Microbiology*, 75:(6), 2006, 702-707.
- CAIRNS, J. Jr. & NIEDERLEHNER, B. R. Ecological Toxicity Testing. *Lewis Publishers*, Boca Raton, USA. 228p.
- CETESB, Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Água – teste de toxicidade aguda com peixes – parte I – sistema estático. São Paulo. v. II, 1999, 1-29.
- CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L.; BOYETTE, C.D.; RINDINGS, W.H.; TEBEEST, D.O.; DYKE, C.G. van; WORSHAM, A.D. Evaluation of *Alternaria cassiae* as a mycoherbicide for sicklepod (*Cassia obtusifolia*) in regional field tests, Southern Cooperative Series. Alabama, 1986. *South Cooperative Serie Bulletin* n. 317, 19 p.
- FIGUEIREDO, G. de, FONTES, E. G., TEIXEIRA, C. A. B. & PAIS, J. S., Levantamento e seleção de patógenos para controle biológico de fedegoso (*Senna obtusifolia*). *Fitopatologia Brasileira*, 17: 1992, 169.
- IBAMA, Avaliação da toxicidade aguda para peixes. Parte D. 3. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, DF, 1987, 23p.
- JURAIR, A.M.N. & KHAN, A., A new species of *Alternaria* on *Cassia holsericea*. *Fresen. Pak. J. Sci. Ind. Res.*, Karachi, v.3, 1960, 71-72.
- PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60: 1982, 1010-1016.
- PITELLI, R.A.; CHARUDATTAN, R. & DEVALERIO, J., Biocontrol of sicklepod by preemergent soil-incorporation of *Alternaria cassiae* spores. American Phytopathological Society Annual Meeting, 84, Nashville (TE), 1993. Abstracts, p.21.
- PITELLI, R.A.; CHARUDATTAN, R. & DEVALERIO, J., Biological control of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) by preemergent soil-incorporation of *Alternaria cassiae* spores and

- flumetsulam American Weed Science Society Annual Meeting, 34^o, Saint Louis, 1994. Abstracts, p. 37.
- PITELLI, R.A.; CHARUDATTAN, R.; DEVALERIO, J.T. Effect of *Alternaria cassiae*, *Pseudocercospora nigrigans*, and soybean (*Glycine max*) planting density on the biological control of sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Technology*, Champaign, v.12, p.37-40, 1998.
- PITELLI, R.A.; DURIGAN, J.C. Ecologia das plantas daninhas no sistema de plantio direto. In: ROSSELO, R.D. *Siembra Directa en el Cono Sur*. Procisur, Montevideo, 2001, v. 1, p. 203-210.
- RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R., *Fundamentals of aquatic toxicology*. HEMISPHERE, Washington, 1985, 665p.
- ROTEM, J., *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. St. Paul, Minnesota, 1994, 326 p.
- SISINNO, C., BULUS, M., RIZZO, A., SÁFADI, R., FONTES, A. & MOREIRA, J., Ensaio ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos, pp. 150-154. In: *III Seminário Nacional de Saúde e Ambiente*, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004, 164p.
- ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E., *Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações*. RIMA, São Carlos, 2008. 478p.
- WALKER, H.L. & BOYETTE, C.D., Biocontrol of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) in soybeans (*Glycine max*) whit *Alternaria cassiae*. *Weed Sci.*, Champaign, v.33, 1986, 212-215.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO FUNGO *Alternaria cassiae* COMO ORGANISMO-TESTE PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

RESUMO - No Brasil os testes ecotoxicológicos são realizados com diversos organismos, porém para a avaliação da poluição dos solos apenas as minhocas são utilizadas como organismo-teste ou bioindicador e não há normas de testes para os outros organismos. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a sensibilidade e a variação da resposta do fungo *A. cassiae* ao dicromato de potássio como substância de referência. Para a determinação da concentração efetiva (CE (I)50;7d), foram realizados sete testes com as concentrações 0,0; 50,0; 90,0; 130,0; 170,0; 210,0; e 250,0 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio no meio de cultivo BDA, mantido em placas de Petri. O dicromato de potássio foi adicionado ao meio após a autoclavagem, quando este ainda apresentava consistência líquida. Após o resfriamento e solidificação do meio, nas placas, foi colocado um disco com 6,5 mm de *A. cassiae*. As placas inoculadas foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. O crescimento do fungo foi avaliado por meio de medidas transversais do diâmetro da colônia. A CE (I)50;7d estimada foi de 65,97 ± 9,48 mg.L⁻¹. No controle não ocorreu inibição do crescimento. Em 50 mg.L⁻¹ a inibição foi de 29%; em 90 mg.L⁻¹, de 72%; em 130 mg.L⁻¹, de 86%; em 170 mg.L⁻¹, de 92%; em 210 mg.L⁻¹, de 95%; e em 250 mg.L⁻¹, de 94%. Assim, há viabilidade na utilização do fungo *A. cassiae* como representante dos microorganismos do solo em testes ecotoxicológicos e o dicromato de potássio pode ser utilizado como substância de referência.

Palavras chave: dicromato de potássio, microorganismos, substância de referência, solo, toxicidade,

EVALUATION OF THE SENSITIVITY OF THE FUNGY *Alternaria cassiae* AS ORGANISM-TESTE FOR TESTING ECOTOXICOLOGICAL

SUMMARY - In Brazil the ecotoxicological tests are conducted with various organisms, but among the soil organisms only earthworms have standardized tests. For other soil organisms there are not standard methods for these studies. The objective of this study was to evaluate the adequacy of potassium dichromate as substance reference to the fungus *Alternaria cassiae*. To determine the effective concentration (EC (I)50;7d), seven tests were conducted using the concentrations (0.0, 50.0, 90.0, 130.0, 170.0, 210.0, and 250 , 0 mg.L⁻¹) in the BDA media. The respective potassium dichromate concentrations were introduced in the BDA medium while it had liquid consistency. After cooling and solidification of the medium was placed on each plate, a disc with 6.5 mm of *A. cassiae*, which were incubated at 25 °C with photoperiod of 12 hours for seven days. The EC (I)50;7d estimated was 65.97 ± 9.48 mg.L⁻¹. In concentration of 0.0 mg.L⁻¹ there was no growth inhibition. In 50 mg.L⁻¹ inhibition was 29%, in 90 mg.L⁻¹, 72%; in 130 mg.L⁻¹, 86%; in 170 mg.L⁻¹, 92%; in 210 mg.L⁻¹, of 95% and in 250 m.L⁻¹ was 94%. Thus, it is feasible using the fungus *A. cassiae* as the representative of microorganisms in the soil ecotoxicological tests and the potassium dichromate as reference substance.

Key words: potassium dichromate, microorganisms, soil, substance reference, toxicity

INTRODUÇÃO

A intensificação da produção agrícola tem aumentado o consumo de agrotóxicos e fertilizantes (Ferreira *et al.*, 2007). Este processo tem causado impactos negativos na sustentabilidade dos agroecossistemas e na microbiologia dos solos. Deste modo, as avaliações de riscos ecotoxicológicos dos agrotóxicos devem ser cada vez mais abrangentes e com organismos representativos das funções ecológicas que mantêm o sistema produtivo. A estrutura da comunidade microbiana é uma característica importante na funcionalidade do solo. Esta comunidade é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia no solo, influencia a transformação da matéria orgânica, a estocagem e liberação do carbono e nutrientes minerais (Jenkinson & Ladd, 1981).

No Brasil, os testes ecotoxicológicos com agrotóxicos são realizados com diversos organismos como microcrustáceos, peixes, aves, abelhas, algas, entre outros. Porém, para a avaliação da toxicidade em organismos do solo são realizados testes apenas com anelídeos, mais especificamente com minhocas (IBAMA, 1987). Para os demais organismos presentes no solo, tais como: bactérias, protozoários, artrópodos, nematóides e fungos não há a exigência de realização de testes para o registro dos agrotóxicos e nem há normas de testes de toxicidade aguda ou crônica (Römbke & Knacker, 2003).

A OECD (2000a e 2000b) estabelece normas para testes ecotoxicológicos com microrganismos do solo com base nas transformações do nitrogênio e do carbono no solo, como forma de avaliar os riscos do uso de agrotóxicos na atividade microbiana global. Neste testes não há a caracterização da microbióta edáfica, que pode ser a causa das grandes variações dos resultados obtidos para um mesmo tipo de solo, mesmo em condições padronizadas de laboratório. Por isso, é importante que sejam eleitos alguns organismos-teste ou bioindicadores que possam contribuir para a melhor compreensão da ação destas substâncias na biologia dos solos.

Para a validação de uma resposta ecotoxicológica é necessária a padronização do organismo e de sua resposta à variação da relação concentração-mortalidade ou concentração-inibição do crescimento. A eleição de organismos testes para avaliações

da toxicidade de agrotóxicos em condições de laboratório segue os seguintes critérios: os organismos devem ser representativos de um grupo taxonômico de importância ambiental; ser de fácil disponibilidade para execução de teste; existência de informações adequadas da espécie e, sempre que possível, ser uma espécie nativa (Rand & Petrocelli, 1985).

Vários organismos do solo podem ser utilizados para estudos ecotoxicológicos. Assim, os fungos podem ser opções interessantes, pois a relação entre fungos e bactérias na biomassa microbiana de diferentes tipos de solos varia entre 63 e 82% para fungos e entre 18 e 37% para bactérias (Ananyeva *et al.*, 2006).

Algumas espécies de fungos exercem funções ambientais bem conhecidas e de relevante importância que justificam sua inclusão em testes ecotoxicológicos, como o fungo *Alternaria cassiae* (Jurair & Khan, 1960). Este microorganismo tem ampla distribuição geográfica, pois são encontrados na Ásia (Jurair & Khan, 1960), na América do Norte (Walker & Boyette, 1982) e na América do Sul (Figueiredo *et al.*, 1992).

O fungo *A. cassiae* é de fácil produção em laboratório (Ávila *et al.*, 2000) com crescimento radial rápido e uniforme, é de fácil obtenção e cultivo e as avaliações de crescimento nos testes é facilitada devido ao fato da colônia do fungo ter coloração escura. Além disso, este microorganismo pode ser utilizado como agente de controle biológico para plântulas de *Senna obtusifolia* (Pitelli *et al.*, 1998). Assim, este trabalho teve como objetivo determinar a viabilidade de utilização do fungo *A. cassiae* como organismo-teste em testes ecotoxicológicos com organismos do ambiente terrestre com a substância de referência dicromato de potássio.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do fungo

A cepa do fungo *A. cassiae* utilizado no experimento foi fornecido pelo Laboratório de Controle Biológico de Plantas Daninhas do CENARGEN/EMBRAPA e está armazenado na micoteca do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em

Matologia (NEPEAM) do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal (Figura 1).



Figura 1. Fotografia dos tubos de ensaio contendo a colônia-estoque do fungo *Alternaria cassiae* armazenada na micoteca do NEPEAM, Unesp, Jaboticabal.

Método de cultivo

Para o cultivo foi utilizando o meio de cultura BDA (batata-dextrose-água). Para a preparação de um litro de meio foram utilizados 200 g de batata, 20 g de dextrose e 15 g de água (Dhingar & Sinclair, 1985). A batata foi descascada e colocada para cozinhar por dez minutos. Após o cozimento, foi realizada a filtragem do caldo de cozimento. A seguir, ao filtrado foi adicionados 20 g de dextrose e homogeneizado por três minutos. Esta mistura foi transferida para um frasco erlenmeyer com 15 g de água e autoclavados a 120°C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos.

Após este processo, o meio foi vertido em placas de Petri de vidro com 14 cm de diâmetro para a sua solidificação. A seguir, foi colocado um disco da colônia com 6,5 mm de diâmetro de *A. cassiae* no centro de cada placa. Este disco foi retirado da região de crescimento ativo da colônia. Estas placas foram incubadas em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD) a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, por 20 dias. A repicagem

do fungo foi realizada semanalmente, para se obter colônias em atividade de crescimento para serem utilizadas nos testes.

Avaliação da sensibilidade do fungo a substância de referência

Para a avaliação da sensibilidade do fungo *A. cassiae* foi utilizado dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) como substância de referência

O cromo hexavalente tem sido empregado como substância de referência para verificar a sensibilidade de vários organismos (daphnias e peixes) utilizados em testes ecotoxicológicos (USEPA, 2002; ABNT, 2004; Zagatto & Bertoletti, 2006).

Inicialmente foram realizados testes preliminares de toxicidade aguda com o dicromato de potássio (DCP) para a determinação dos intervalos de concentração que causam zero e 100% de inibição no crescimento do fungo conforme metodologia adaptada do IBAMA (1987). Com base nos resultados dos testes preliminares foi estabelecido o intervalo de concentrações de 50,0; 90,0; 130,0; 170,0; 210,0; e 250,0 $mg.L^{-1}$ utilizado nos sete testes definitivos realizados com três repetições em cada teste.

Os testes foram realizados em meio BDA com redução de 10% no seu volume final de água. Este procedimento foi adotado, para permitir a diluição da substância de referência no meio sem perder a concentração dos ingredientes do meio.

Em uma câmara de fluxo laminar (VECO®), as soluções de diluição foram adicionadas ao meio de cultura pré-autoclavado, na temperatura de $\pm 50\text{ }^{\circ}C$ na proporção (1:9; v/v), ou seja, 10 vezes o valor da concentração final do meio para a manutenção da concentração desejada (Figura 2A, B, C e D).

A seguir, o meio foi vertido em placas de Petri de vidro com 9 cm de diâmetro. Após a solidificação foi colocado um disco com 6,5 mm de diâmetro de *A. cassiae* no centro de cada placa de Petri. Este disco de micélios foi retirado da região ativa de uma colônia. Estas placas foram vedadas com filme plástico e transferidas para uma estufa (BOD) a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. O período de incubação foi de sete dias (Figura 2E, F).

A avaliação do crescimento foi diária por meio de medição do diâmetro em dois eixos perpendiculares e subtração de 6,5 mm como fator de correção, correspondente ao diâmetro inicial (Figura 2H).

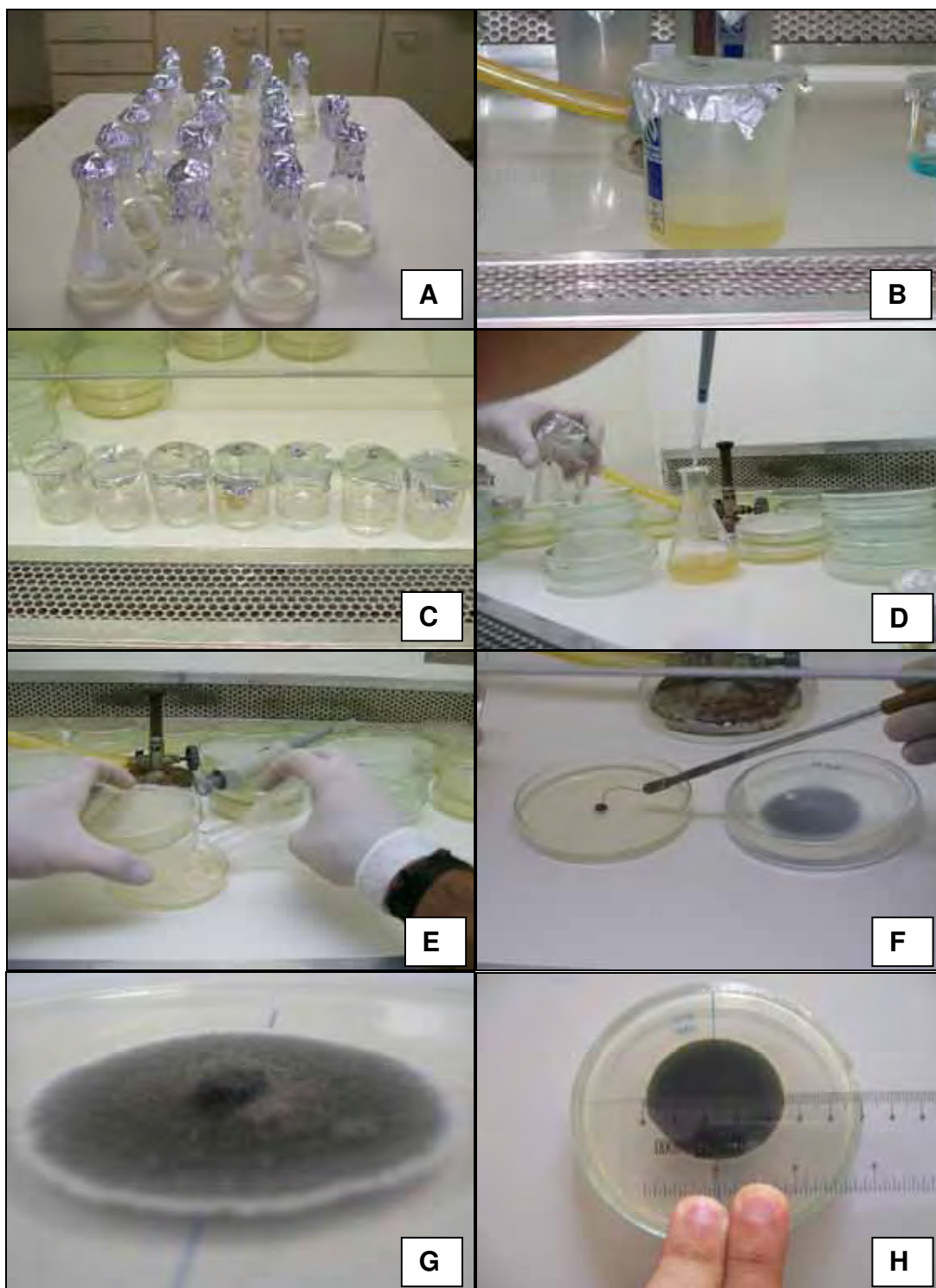


Figura 5. Fotografias da metodologia utilizada: (A) Meios prontos para serem autoclavados; (B) Solução Estoque; (C) Soluções de diluição; (D) Introdução do DCP no meio de cultura; (E) Meio sendo vertido na placa de Petri; (F) Disco do fungo sendo repicado; (G) Detalhe da colônia de *Alternaria cassiae*; (H) Avaliação do crescimento da colônia fúngica.

Para cada concentração foram estimadas as porcentagens de inibição no crescimento (IC) radial do micélio do fungo com a equação:

$$IC(\%) = \left(1 - \frac{DMCP}{DMCC}\right) * 100$$

Sendo:

IC = inibição do crescimento;

DMCP = diâmetro médio das colônias expostas ao produto;

DMCC = diâmetro médio das colônias controle.

Esta fórmula também foi utilizada por Mourão *et al.* (2003) para avaliar o desenvolvimento de colônias do fungo *Beauveria bassiana*.

Os valores de (CE (I)50;7d) e seus limites inferior e superior foram estimados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977). Todos os cálculos foram realizados com o programa computacional estatístico “EC50 GWbasic Test”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados preliminares, a maior concentração que não inibe o crescimento do fungo foi 50 mg.L⁻¹ e a menor concentração que inibiu totalmente o crescimento do fungo foi 200 mg.L⁻¹. Assim foi estabelecido o intervalo de concentração de dicromato de potássio (50; 90; 130; 170; 210; 250 mg.L⁻¹) e um controle, para os testes definitivos (Figura 3).

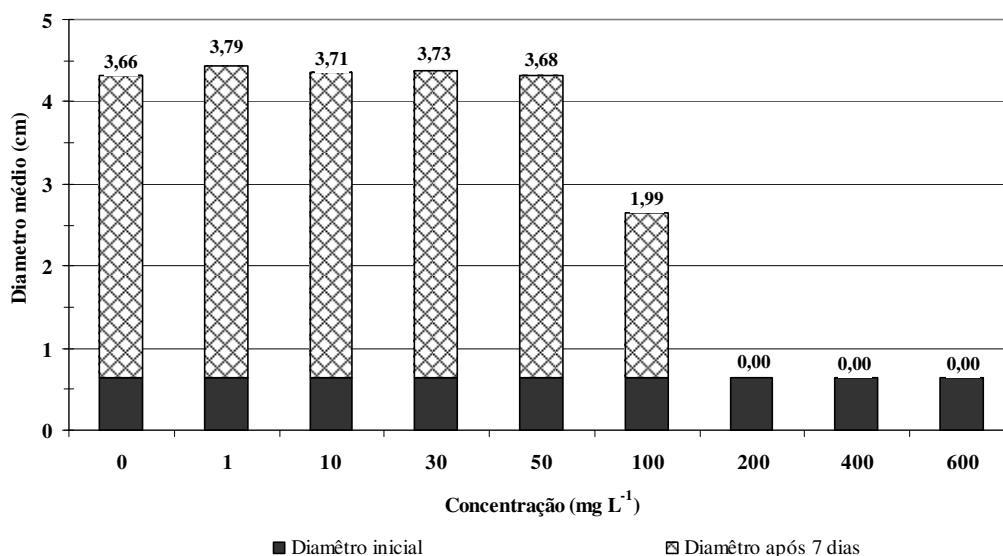


Figura 3. Diâmetros de colônias de *Alternaria cassiae* crescendo em meio com diferentes concentrações da DCP, após sete dias de incubação no teste preliminar.

A concentração efetiva (CE (I)50;7d) média do dicromato de potássio para o fungo *Alternaria cassiae* foi de $65,97 \pm 9,48$ mg.L⁻¹. A menor CE (I)50;7d estimada foi de 43,53 mg.L⁻¹ e a maior, 77,41 mg.L⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração Efetiva 50% (CE (I)50;7d), limite superior, limite inferior e coeficiente de variação do dicromato de potássio para o fungo *Alternaria cassiae*.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Testes realizados							Média ± DP ¹
	1	2	3	4	5	6	7	
Lim. Superior	70,55	61,35	82,60	75,02	83,50	70,38	68,15	73,08 ± 7,94
EC(I) 50-7d	67,08	51,15	77,25	67,61	77,41	59,64	61,67	65,97 ± 9,48
Lim. Inferior	63,79	42,65	72,25	60,94	71,94	68,15	55,82	59,71 ± 10,91
CV (%)								14,38

¹ Desvio padrão

O coeficiente variação foi de 14,38% entre os sete testes de toxicidade aguda (Tabela 1). Esta variação está de acordo com a variação aceitável inter-testes para com outros organismos padronizados para estudos ecotoxicológicos. Estes podem apresentar uma variação aceitável entre testes de 30% (ENVIRONMENT CANADA, 1990), enquanto que a USEPA (2002) e o IBAMA (1987) limitam esta variação em 20%

entre testes ecotoxicológicos para organismos aquáticos para compensar a variabilidade genética entre os organismos utilizados nos testes. A OECD (2006) considera aceitável a variação de 9 a 22% entre testes intra-laboratório e 92% inter-laboratório, na determinação da inibição da atividade de bactérias anaeróbicas. Nos resultados ora apresentados observa-se que a variabilidade foi inferior às exigências das agências reguladoras oficiais.

Os fungos se reproduzem tanto sexuadamente por esporos como assexuadamente pelo crescimento micelial e conídios (Pelczar *et al.*, 1996). Na manutenção e preparo de colônias para a realização do teste de toxicidade aguda, a reprodução do fungo *A. cassiae* foi basicamente por repicagem do micélio (assexuada), o que ocasiona uma baixa variabilidade genética da colônia e pode explicar a baixa variação de resposta ao dicromato de potássio entre os testes.

Assim, com esse mecanismo de reprodução e manutenção das colônias em meio BDA, o fungo *A. cassiae* pode ser utilizado como organismo-teste para testes de toxicidade aguda representando os organismos do solo, pois atende aos requisitos básicos como ampla distribuição geográfica, importância ambiental, fácil cultivo e obtenção e baixa variação de resposta à substância teste (Rand & Petrocelli, 1985) e importância na dinâmica dos agroecossistemas (Pitelli *et al.*, 1998).

A variação da resposta ao dicromato de potássio do fungo *Alternaria cassiae* foi similar a alguns organismos-testes padronizados em testes ecotoxicológicos, como a *Daphnia similis* com coeficiente de variação de 30% entre testes (Zagatto, 1988), o *Brachydanio rerio* com 12,6% (Bertoletti *et al.*, 1989), a *Ceriodaphnia silvestrii* com 28% (Oliveira-Neto & Botta-Paschoal, 2000) e a *Hyalella azteca* com 19,5% (Araújo, 2005).

O fungo *A. cassiae* foi mais sensível ($65,97 \text{ mg.L}^{-1}$) do que as minhocas (*Eisenia foetida*) com 222 mg.kg^{-1} , organismo-teste descrito em normas para testes ecotoxicológicos em ambiente terrestre, quando expostos ao dicromato de potássio (Sivakumar & Subbhuraam, 2005)

O modelo de regressão quadrático apresentou excelente ajuste aos resultados de porcentagem de inibição de crescimento do fungo, com $R^2 = 0,93$ (Figura 4). Ao substituir nesta equação o valor médio da concentração efetiva 50% (CE (I)50;7d) de $65,97 \text{ mg.L}^{-1}$ a resposta em $y = 50,9\%$ de inibição, confirmando o melhor ajuste deste

modelo. O modelo linear não se ajustou adequadamente e seu coeficiente de determinação foi menor com $R^2 = 0,77$, porém, confirmou que 210 mg.L⁻¹ de DCP é a concentração onde ocorre o ponto de inflexão da curva de segundo grau (Figura 4).

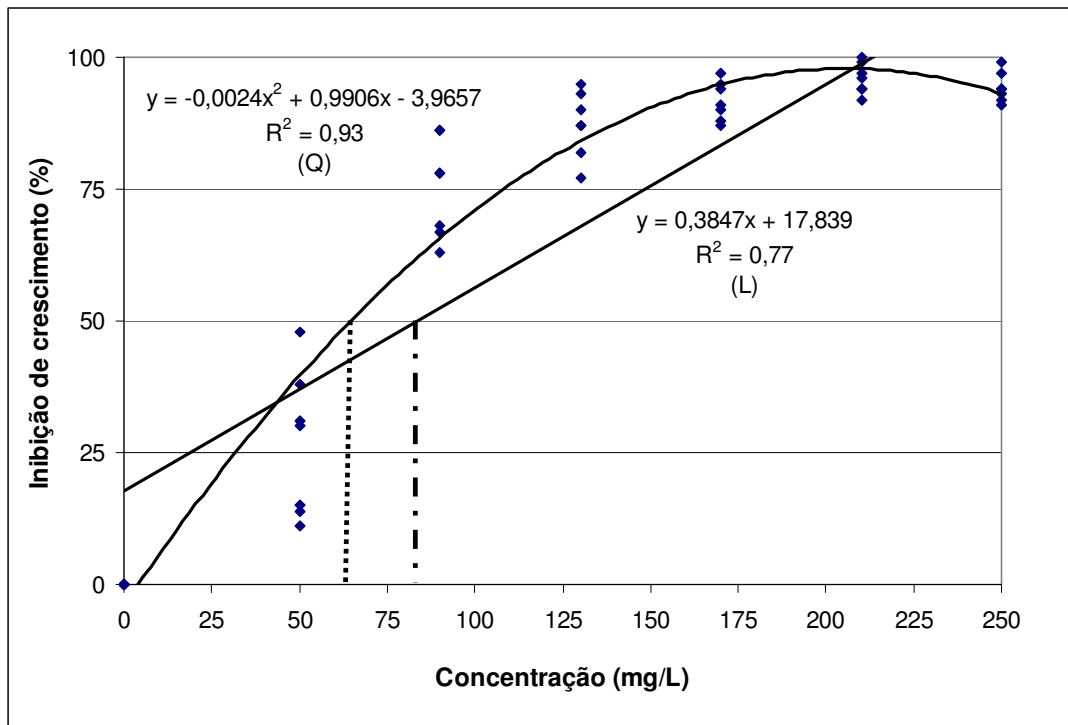


Figura 4. Curvas de dose resposta linear e quadrática da inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* com o aumento da concentração de dicromato de potássio.

O melhor modelo foi obtido pelo ajuste da curva sigmoidal que representa a relação concentração-efeito, onde ocorre inicialmente uma relação direta do aumento de concentração com a inibição do crescimento da colônia do fungo. A partir de 170 mg.L⁻¹ a atividade metabólica da colônia estava totalmente ocupada com o DCP, não ocorrendo alteração nos valores de inibição do crescimento do fungo até as maiores concentrações avaliadas (Figura 5).

Segundo Rang *et al.* (2001) a relação concentração-efeito depende diretamente da capacidade do organismo apresentar receptores ou capacidade metabólica para uma determinada substância, porém esta capacidade apresenta um limiar devido a dependência de interação entre o xenobiótico e o organismo.

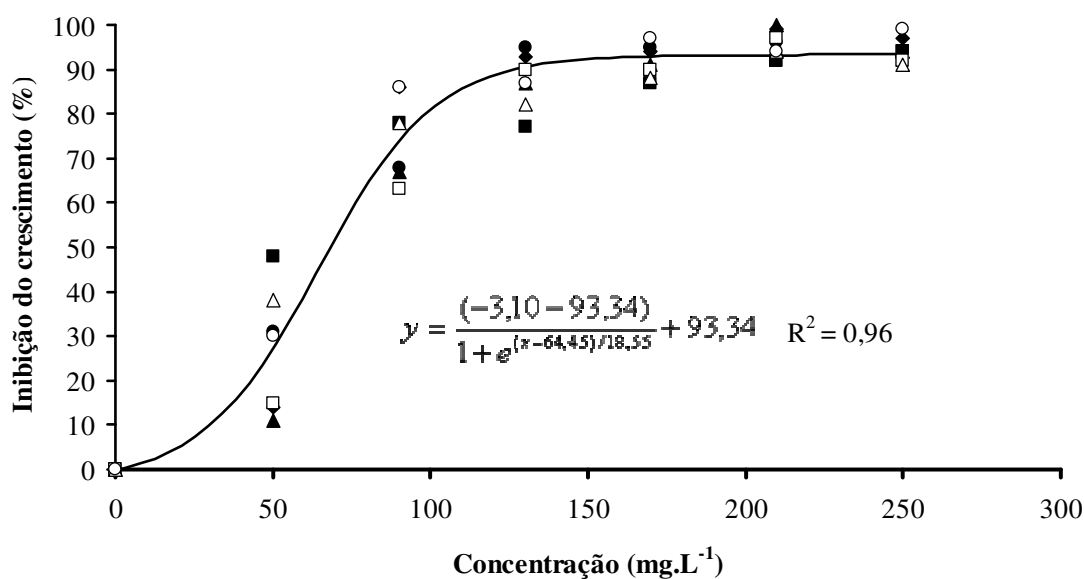


Figura 5. Curva de dose resposta sigmoideal da inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* com o aumento da concentração de dicromato de potássio.

As porcentagens médias de inibição do crescimento radial do fungo nos sete testes foram de 11 a 48% com 50,0 mg.L⁻¹; de 63 a 86% com 90 mg.L⁻¹; de 77 a 93% com 130 mg.L⁻¹; de 87 a 97% com 170 mg.L⁻¹; de 92 a 100% com 210 mg.L⁻¹; e de 91 a 99% com 250 mg.L⁻¹ de DCP (Tabela. 2).

A capacidade metabólica do fungo é influenciada pela concentração e pelo tempo de exposição à substância (Tabela. 2).

Tabela 2. Porcentagem média de inibição (%) no crescimento radial do fungo *Alternaria cassiae* nos sete testes de toxicidade aguda com o dicromato potássio.

DCP ¹ (mg.L ⁻¹)	Testes realizados							Média ± DP ²
	1	2	3	4	5	6	7	
controle	0	0	0	0	0	0	0	0
50	14	48	11	31	15	38	30	29±13,8 c
90	86	78	67	68	63	78	86	72±9,1 b
130	93	77	87	95	90	82	87	86±6,0 ab
170	94	87	91	95	90	88	97	92±3,5 a
210	99	92	100	96	97	94	94	95±2,9 a
250	97	94	94	93	92	91	99	94±2,9 a
F								84,55 **
Desvio Padrão								7,6
CV (%)								9,70

¹Dicromato de potássio. ²Desvio padrão

O fungo *Fusarium oxysporum* exposto a 300 mg.L⁻¹ de substâncias húmicas apresentou 40% de inibição de crescimento. Porém a partir de 72 horas de exposição, o fungo começou a metabolizar e utilizar esta substância para estimular seu crescimento, em relação ao controle. Na exposição a 100 mg.L⁻¹ não ocorreu inibição no crescimento inicialmente, porém após 132 horas de ocorreu acréscimo de 10% em sua taxa de crescimento, em relação ao controle (Loffredo *et al.*, 2007). Estas respostas de metabolismo e tempo de exposição não foram observadas para o *A. cassiae* (Tabela 2).

CONCLUSÃO

Com base na avaliação da sensibilidade e no padrão de resposta ao dicromato de potássio, o fungo *A. cassiae* pode ser utilizado como organismo-teste em testes ecotoxicológicos, como representante dos microorganismos do solo. A resposta desse fungo a substância de referência está de acordo com um padrão de aceitabilidade de desempenho laboratorial, pois durante a execução dos testes de toxicidade a colônia tem capacidade de sair do equilíbrio (homestase) e atingir rapidamente o ponto de não retorno ou de inibição total de seu crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas., *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes*. NBR:15088, 2004, 19p.
- ANANYEVA, N.D., SUSYAN, E.A., CHERNOVA, O.V., CHERNOV, I.Yu. & MAKAROVA, O.L., The ratio of fungi and bacteria in the biomass of different types of soil determined by selective inhibition. *Microbiology*, 75:(6), 2006, 702-707.
- ARAÚJO, R.P.A., Testes de toxicidade como instrumento na avaliação dos sedimentos de água doce do Estado de São Paulo. [Tese de doutorado – Instituto de Biociências/USP]. 209 p. + anexos, 2005.
- ÁVILA, Z.R., MELLO, S.C.M., RIBEIRO, Z.M.A. & FONTES, E.M.G., Produção de inóculo de *Alternaria cassiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 35: 2000, 533-541.
- BERTOLETTI, E., GHERARDI-GOLDSTEIN, E., ZAGATTO, P.A., Variabilidade de testes de toxicidade de peixes. *Ambiente*, 6 (1): 1989, 52-58.
- DHINGAR, O.D. & SINCLAIR, J.B., *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985, 355p.
- ENVIRONMENT CANADA, *Guidance document on control toxicity test precision using reference toxicants*. Report EPS 1/RM/12. 1990, 85p.
- FERREIRA, C.R.R.P.T., VEGRO, C. L. R. & CAMARGO, M. L. B., Defensivos Agrícolas: expectativa de aumento da demanda em 2007. *Análises e indicadores do Agronegócio*, 2:(7), 2007, 1-10.
- FIGUEIREDO, G., FONTES, E.G. TEIXEIRA, C.A.B. & PAIS, J.S., Levantamento e seleção de patógenos para controle biológico de fedegoso (*Senna obtusifolia*). *Fitopatologia Brasileira*, 17: 1992, 169.
- HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C. & THURSTON.V., Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v.7, 1977, 714-719.
- IBAMA, *Avaliação da toxicidade aguda para peixes. Parte D. 3. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos*. Brasília, DF, 1987, 23p.

- JENKINSON, D.S. & LADD, J.N., Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A. & LADD, J.N., eds., *Soil Biol. Biochem.*, 5: 1981, 415-471.
- JURAIR, A.M.N. & KHAN, A., A new species of *Alternaria* on *Cassia holsericea*. *Fresen. Pak. J. Sci. Ind. Res.*, Karachi, v.3, 1960, 71-72.
- LOFFREDO, E., BERLOCO, M., CASULLI, F. & SENESI, N., In vitro assessment of the inhibition of humic substances on the growth of two strains of *Fusarium oxysporum*. *Biol. Fertil. Soils*, 43: 2007, 759-769.
- MOURÃO, S.A., VILELA, E.F., ZANUNCIO, J.C., ZAMBOLIM, L. & TUELHER, E.S., Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *Neotropical Entomology*, nº 32, v.1, 2003, 103-106.
- OECD, Organization Economic Cooperation Development., *Guidelines for the testing of chemicals. Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test*. n. 217, 2000a, 10p.
- OECD, Organization Economic Cooperation Development., *Guidelines for the testing of chemicals. Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test*. n. 216, 2000b, 10p.
- OECD, Organization Economic Cooperation Development., *Guidelines for the testing of chemicals proposal for a new guideline. Determination of the inhibition of the activity of anaerobic bacteria – reduction of gas production from anaerobically sewage sludge*. 2006, 8p.
- OLIVEIRA-NETO, A.L. & BOTTA-PASCHOAL, C.M.R., Sensibilidade de cladocera lacustre planctônico *Ceriodaphnia silvestrii* (Família Daphnidae) aos metais cádmio, cromo e chumbo. In: ESPÍNDOLA, E.L.G., et al. (eds). *Ecotoxicologia Perspectivas para o século XXI*. RIMA. São Carlos. 2000, pp 537-543.
- PELCZAR, M.J., CHANG, E.C.S. & KRIEG, N.R., *Microbiologia: conceitos e aplicações*. Volume II, 2ª ed. São Paulo: Makron Books 1996,.
- PITELLI, R.A.; CHARUDATTAN, R. & DEVALERIO, J.T., Effect of *Alternaria cassiae*, *Pseudocercospora nigricans*, and soybean (*Glycine max*) planting density on the biological control of sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Technology*, 12: 1998, 37-40.
- RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., *Fundamentals of aquatic toxicology*. HEMISPHERE, Washington, 1985, 665p.
- RANG, H.P. DALE, M.M. RITER, J.M. *Farmacologia*, Ed. 4ª Editora, Guanabara Koogan, 2001, 703p.

- RÖMBKE, J. & KNACKER, T., Standardisation of Terrestrial Ecotoxicological Effect Methods: An example of successful international co-operation. *J. Soils & Sediments*, 3: 2003, 237-238.
- SIVAKUMAR, S. & SUBBHURAAM, C.V., Toxicity of chromium(III) and chromium(IV) to the earthworm *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 2005, 93-98.
- USEPA, 2002, United States Environmental Protection Agency. *Guidelines for the health: risk assessment guidance for superfund (RAGS)*. Disponível em: <www.epa.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7>. Acesso em: 01 dez. 2007.
- ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E., *Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações*. RIMA, São Carlos, 2006, 478p.
- ZAGATTO, P.A., Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de culturas. *Ambiente*, 2 (2): 1988, 79-83.
- WALKER, H.L. & BOYETTE, C.D., Biocontrol of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) in soybeans (*Glycine max*) with *Alternaria cassiae*. *Weed Sci.*, Champaign, v.33, 1982, 212-215.

CAPÍTULO 3 - TOXICIDADE AGUDA E CLASSIFICAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DE HERBICIDAS PARA O FUNGO *Alternaria cassiae*

RESUMO - Os herbicidas são utilizados na agricultura para o controle de plantas daninhas, em aplicações em pré ou pós-emergência, mas sempre atingem o solo. A avaliação dos efeitos da aplicação dos herbicidas sobre os microrganismos do solo ainda é pouco estudada. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a toxicidade aguda (CE (I)50-7d) e avaliar o risco ambiental de doze formulações de herbicidas para o fungo *Alternaria cassiae*. Para tanto, foram realizados três testes de toxicidade aguda para cada formulação de herbicida em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, e os resultados de avaliações diárias da inibição do crescimento da colônia fúngica foram analisados estatisticamente. A concentração efetiva média estimada foi $> 2500,00 \text{ mg.L}^{-1}$ para amicarbazone; de $1317,83 \text{ mg.L}^{-1}$ para MSMA; de $1846,36 \text{ mg.L}^{-1}$ para 2,4-D amina; de $2213,42 \text{ mg.L}^{-1}$ para imazethapyr; de $600,33 \text{ mg.L}^{-1}$ para trifluralin; de $469,63 \text{ mg.L}^{-1}$ para glyphosate; de $432,27 \text{ mg.L}^{-1}$ para s-metolachlor; de $317,75 \text{ mg.L}^{-1}$ para oxifluorfen; de $101,52 \text{ mg.L}^{-1}$ para clomazone; de $93,98 \text{ mg.L}^{-1}$ para paraquat; de $58,14 \text{ mg.L}^{-1}$ para fluazifop-p-butyl; e de $35,90 \text{ mg.L}^{-1}$ para amônio-glufosinato. O paraquat, fluazifop-p-butyl e amônio-glufosinato foram classificados como extremamente tóxicos; o trifluralin, glyphosate, s-metolachlor, oxifluorfen e clomazone como muito tóxicos; e o amicarbazone, MSMA, 2,4-D amina e imazethapyr como moderadamente tóxicos. O amicarbazone, o imazethapyr, o 2,4-D amina e o glyphosate quando utilizados nas menores doses não apresentam efeito adverso ao meio ambiente, enquanto que, os demais apresentaram possibilidade de efeito adverso em qualquer cenário de aplicação.

Palavras chave: ambiente terrestre, fungo, microorganismo, toxicidade, xenobióticos

ACUTE TOXICITY AND CLASSIFICATION OF ENVIRONMENTAL RISK OF HERBICIDES FOR THE FUNGY *Alternaria cassiae*

SUMMARY - The herbicides are used on crops to control weeds, and are applied directly on them or on the ground. The assessment of the effects of application of these products on non target organisms like fungus soil is still little studied. The objective of the work was to determine the acute toxicity (EC (I) 50-7d) and assess the environmental risk of twelve formulations of herbicides for the fungus *Alternaria cassiae*. Thus, were carried out three tests of acute toxicity for each formulation in a completely randomized design with three repetitions and evaluation of the inhibition of growth was daily. The estimated average effective concentration was $> 2500.00 \text{ mg.L}^{-1}$ for amicarbazone; of $1317.83 \text{ mg.L}^{-1}$ for MSMA; of $1846.36 \text{ mg.L}^{-1}$ to 2,4-d amine; of $2213, 42 \text{ mg.L}^{-1}$ to imazethapyr; of 600.33 mg.L^{-1} to trifluralin; of 469.63 mg.L^{-1} to glyphosate, of 432.27 mg.L^{-1} to s-metolachlor; of 317.75 mg.L^{-1} to oxifluorfen; of 101.52 mg.L^{-1} to clomazone; of 93.98 mg.L^{-1} to paraquat, of 58.14 mg.L^{-1} to fluazifop-p-butyl, and of 35.90 mg.L^{-1} to gluphosinate-ammonium. The paraquat, fluazifop-p-butyl; and gluphosinate-ammonium were classified as highly toxic, the trifluralin, glyphosate, s-metolachlor, and clomazone oxifluorfen as very toxic, and amicarbazone, msma, 2,4-d amine and imazethapyr as moderately toxic. The amicarbazone, imazethapyr, 2,4-d amine and glyphosate when used in low doses have no adverse effect to the environment, whereas the other had a broad range of possibility of adverse effect on any scenario of application.

Key words: environment land, fungus, microorganismic, toxicity, xenobiotics

INTRODUÇÃO

A comunidade microbiana exerce papel importante na funcionalidade do solo. Os microrganismos auxiliam na manutenção da fertilidade pela quebra e transformação da matéria orgânica, atuam no microambiente formado na rizosfera das plantas, estabelecem relações bióticas fundamentais para as plantas e animais, decompõem os resíduos orgânicos (Jenkinson & Ladd, 1981).

A maioria dos microrganismos do solo ainda é desconhecida e a sua manutenção em condição de laboratório para a realização de estudos ecotoxicológicos ainda é incipiente. Algumas espécies exercem funções ambientais bem conhecidas e de relevante importância ecológica, o que justificaria sua inclusão em testes ecotoxicológicos, como por exemplo, o fungo *Alternaria cassiae* (Jurair & Khan, 1960).

Os fungos podem ser opções interessantes, pois a relação entre fungos e bactérias na biomassa microbiana de diferentes tipos de solos varia entre 63 e 82% para fungos e entre 18 e 37% para bactérias (Ananyeva *et al.*, 2006).

A agricultura brasileira ocupa uma área de 76.697.079 ha com expansão de 36.695.966 ha nos últimos 30 anos (IBGE, 2006). A intensificação da produção agrícola tem aumentado expressivamente o consumo de agrotóxicos, um mercado que movimentou US \$ 3,92 bilhões, no Estado de São Paulo, no ano 2006 (Ferreira *et al.*, 2007).

A classe dos herbicidas, agrotóxicos usados no controle de plantas daninhas, representa 46,4% de todos os produtos comerciais vendidos no Estado de São Paulo, com o valor de US \$ 348,10 milhões (SINDAG, 2006).

Assim, cada vez mais a sustentabilidade, os nutrientes e a microbiota dos solos podem ser influenciados pela utilização destes produtos. Deste modo, as avaliações de riscos ambientais destas substâncias devem ser cada vez mais abrangentes e contemplar o principal patrimônio da agricultura, o solo fértil e sadio.

As avaliações de risco são baseadas em uma série de informações dos xenobióticos, que envolve as propriedades químicas e físicas e a atividade biológica. Para as informações sobre as atividades biológicas são realizados vários estudos, incluindo os testes ecotoxicológicos (Zagatto & Bertoletti, 2008).

Os herbicidas utilizados neste trabalho apresentam diferentes modos de ação. O objetivo deste trabalho foi determinar a toxicidade aguda e avaliar o risco ambiental para doze formulações de herbicidas (amicarbazone, amônio-glufosinato, clomazone, 2,4-D amina, fluazifop-p-butyl, glyphosate, imazethapyr, MSMA, oxyfluorfen, paraquat, s-metolachlor e trifluralin) para o fungo *Alternaria cassiae*, fungo que provoca “damping-off” em plântulas de *Senna obtusifolia*, utilizado no controle biológico natural em áreas de plantio direto.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do fungo

A cepa do fungo *A. cassiae* utilizado no experimento foi fornecido pelo Laboratório de Controle Biológico de Plantas Daninhas do CENARGEN/EMBRAPA e está armazenado na micoteca do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Método de cultivo

O fungo foi cultivado em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Para a preparação de um litro de meio foram utilizados 200 g de batata, 20 g de dextrose e 15 g de ágar (Dhingar & Sinclair, 1985).

A batata foi descascada e colocada para cozinhar por dez minutos. Após o cozimento, foi realizada a filtragem do caldo de cozimento. A seguir, ao filtrado foram adicionados 20 g de dextrose e homogeneizado por três minutos. Esta mistura foi transferida para frascos erlenmeyer com 15 g de ágar. Estes foram autoclavados a 120°C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos.

Após este processo, o meio foi vertido em placas de Petri de vidro com 14 cm de diâmetro para a sua solidificação. Após a solidificação do meio, foi colocado um disco da colônia fúngica com 6,5 mm de diâmetro de *A. cassiae* no centro de cada placa. O disco foi retirado da região de crescimento ativo de uma colônia com menos de sete dias.

Estas placas foram incubadas em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD) a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, por 20 dias. A repicagem do fungo foi realizada semanalmente, com o objetivo de se obter colônias em atividade de crescimento para serem utilizadas nos testes de toxicidade aguda.

Seleção dos herbicidas

Para a avaliação da toxicidade aguda nos testes ecotoxicológicos, foram selecionados herbicidas registrados para as culturas de cana-de-açúcar e soja (Tabela 1). No Brasil, estas duas culturas ocuparam mais de 27 milhões de hectares no ano agrícola de 2007 com previsão de aumento de área para 2008 (IBGE, 2007).

Tabela 1. Ingredientes ativo, concentrações, formulações, modo de ação e classe toxicológica dos herbicidas utilizados nos estudos ecotoxicológicos.

Herbicida	Concentração i.a.	Classe Toxicológica	Modo de ação
amicarbazone ¹	700 g.Kg ⁻¹	II	Inibidor da fotossíntese (fotossistema II)
amônio-glufosinato ²	200 g.L ⁻¹	III	Inibidor da Glutamina Sintetase (GL)
clomazone ³	500 g.L ⁻¹	II	Inibidor da biossíntese de caroteno
2,4-D amina ⁴	806 g.L ⁻¹	I	Mimetizadores da auxina
fluazifop-p-butyl ⁵	250 g.L ⁻¹	III	Inibidor da ACCase (acetil Coa carboxilase)
glyphosate ⁶	480 g.L ⁻¹	III	Inibidor da EPSPS (enol-piruvil-shikimato-fosfato)
imazethapyr ⁷	100 g.L ⁻¹	IV	Inibidor da ALS (acetohidroxiácidosintase)
MSMA ⁸	480 g.L ⁻¹	II	Desconhecido
oxifluorfen ⁹	240 g.L ⁻¹	III	Inibidor da PROTOX (protoporfirinogem oxidase)
paraquat ¹⁰	200 g.L ⁻¹	II	Inibidor da fotossíntese (fotossistema I)
s-metolachlor ¹¹	960 g.L ⁻¹	I	Inibidor da divisão celular
trifluralin ¹²	600 g.L ⁻¹	II	Inibidor da formação de microtúbulos (GL)

¹Dinamic; ²Finale; ³Gamit; ⁴DMA 806 BR; ⁵Fusilade 250 EW; ⁶Roundup Original; ⁷Vezir; ⁸Dessecan; ⁹Goal BR; ¹⁰Gramoxone; ¹¹Dual Gold; ¹²Premierlin 600 CE.

Toxicidade dos herbicidas para o fungo *Alternaria cassiae*

Inicialmente, foram realizados testes preliminares de toxicidade aguda com o todos os 12 herbicidas para a determinação dos intervalos de concentração que causam zero e 100% de inibição no crescimento do fungo *Alternaria cassiae* conforme metodologia adaptada do IBAMA (1987). Para cada herbicida foram realizados três testes definitivos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações utilizadas nos testes definitivos para a determinação da toxicidade aguda dos herbicidas.

Herbicidas		Concentrações						
amicarbazone	0,0	500,0	1000,0	1500,0	2000,0	2500,0		
MSMA	0,0	500,0	1000,0	1500,0	2000,0	2500,0		
2,4-D amina	0,0	500,0	1000,0	1500,0	2000,0	2500,0		
imazetapyr	0,0	500,0	1000,0	1500,0	2000,0	2500,0		
trifluralin	0,0	300,0	600,0	900,0	1200,0	1500,0	1800,0	
glyphosate	0,0	100,0	400,0	700,0	1000,0	1300,0	1600,0	
oxifluorfen	0,0	200,0	400,0	600,0	800,0	1000,0	1200,0	
s-metolachlor	0,0	200,0	400,0	600,0	800,0	1000,0	1200,0	
clomazone	0,0	50,0	100,0	200,0	300,0	400,0	500,0	
paraquat	0,0	25,0	50,0	100,0	150,0	200,0	250,0	300,0
fluazifop-p-butyl	0,0	25,0	50,0	100,0	200,0	300,0	400,0	
amônio-glufosinato	0,0	1,0	25,0	50,0	100,0	150,0	200,0	

A sensibilidade do fungo *Alternaria cassiae* foi avaliada periodicamente com a realização de testes de toxicidade aguda com a substância de referência dicromato de potássio.

Para a realização dos testes foi preparado o meio BDA com redução de 10% no seu volume final de água. Este procedimento foi adotado para permitir a diluição do herbicida no meio e manter a concentração desejada. Em uma câmara de fluxo laminar (VECO®), foram preparadas as soluções de diluição do herbicida em água esterilizada. A seguir, alíquotas destas soluções foram adicionadas ao meio de cultura na temperatura de ± 50 °C na proporção (1:9; v/v), ou seja, 10 vezes o valor da concentração final do meio para a manutenção do valor desejado.

O meio de cultura com o herbicida foi vertido em placas de Petri de vidro com 9 cm de diâmetro. Após a solidificação do meio foi colocado um disco de 6,5 mm de diâmetro de *A. cassiae*, retirado da região ativa de uma colônia. Estas placas foram vedadas com filme plástico e transferidas para uma estufa (BOD) a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. O período de incubação foi de sete dias.

A avaliação do crescimento do fungo foi diária com a medida do diâmetro em dois eixos da colônia em direções perpendiculares e subtração de 6,5 mm como fator de correção, correspondente ao diâmetro inicial.

Para cada concentração foram estimadas as porcentagens de inibição no crescimento (IC) radial do micélio do fungo com a equação:

$$IC(\%) = \left(1 - \frac{DMCP}{DMCC}\right) * 100$$

Sendo:

IC = inibição do crescimento;

DMCP = diâmetro médio das colônias expostas ao produto;

DMCC = diâmetro médio das colônias controle.

Esta fórmula de avaliação de inibição do crescimento também foi utilizada por Mourão *et al.* (2003) para verificar o desenvolvimento de colônias do fungo *Beauveria bassiana*.

Os valores da concentração efetiva (CE (I)50;7d) e seus limites inferior e superior foram estimados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977). Todos os cálculos foram realizados com o programa computacional estatístico “EC50 GWbasic Test”.

A toxicidade aguda dos herbicidas foi classificada conforme metodologia para organismos terrestres adaptada de Roberts & Dorough (1984) (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação da toxicidade aguda para organismos terrestres; adaptado de Roberts & Dorrough, (1984).

EC 50 (mg/m ²)	Classificação
CE $\geq$ 10000	Praticamente não tóxico
1000 $\leq$ CE < 10000	Moderadamente tóxico
100 $\leq$ CE < 1000	Muito tóxico
10 $\leq$ CE < 100	Extremamente tóxico
CE < 10	Super tóxico

A avaliação do risco ambiental para o fungo *Alternaria cassiae* foi obtida com o cálculo da concentração ambiental estimada (CAE), no pior cenário (maior dose recomendado prevista no registro) e no melhor cenário (menor dose recomendada) para os herbicidas.

A classificação do risco ambiental foi realizada pelo método do quociente (Q) obtido pela divisão da concentração ambiental estimada (CAE) pelos valores de concentração efetiva (CE (I)50;7d). As classes de risco ambiental utilizadas foram as descritas por Urban & Cook, (1986).

- Nenhum efeito adverso ($Q \leq 0,1$);
- Possibilidade de efeito adverso ($0,1 \leq Q \leq 10$);
- Probabilidade de efeito ($Q > 10$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração efetiva (CE (I)50;7d) média estimada para o fungo *A. cassiae* dos herbicidas foi maior de 2500,00 mg.L⁻¹ para o amicarbazone; de 1317,83 mg.L⁻¹ para o MSMA; de 1846,36 mg.L⁻¹ para o 2,4-D amina; de 2213,42 mg.L⁻¹ para o imazethapyr; de 600,33 mg.L⁻¹ para o trifluralin; de 469,63 mg.L⁻¹ para o glyphosate; de 432,27 mg.L⁻¹ para o s-metolachlor; de 317,75 mg.L⁻¹ para o oxifluorfen; de 101,52 mg.L⁻¹ para o clomazone; de 93,98 mg.L⁻¹ para o paraquat; de 58,14 mg.L⁻¹ para o fluazifop-p-butyl; e de 35,90 mg.L⁻¹ para o amônio-glufosinato (Tabela 4).

Estudando o fungo *Beauveria bassiana*, Mourão *et al.* (2003) observaram os seguintes valores para a concentração efetiva (CE (I)50;14d): 1,0 mg.L⁻¹ para tebuconazole, 20,0 mg.L⁻¹ para triadimenol e triadimenol + dissulfotom, 30,0 mg.L⁻¹ para paration-metílico e clorpirifós-metílico, 4.740,0 mg.L⁻¹ para endossulfam, 57.840,0 mg.L⁻¹ para ethiom e 65.570,0 mg.L⁻¹ para dissulfotom . É relevante considerar que *B. bassiana* é um organismo bastante importante para a cultura do café.

Tabela 4. Média da concentração efetiva 50% e do limite superior e inferior dos herbicidas.

Concentração (mg.L⁻¹)	amicarbazone	MSMA	2,4-D amina	imazethapyr
Limite inferior	-	1078,04	1460,78	-
CE (I)50;7d	> 2500,00	1317,83	1846,36	2213,42
Limite superior	-	1612,94	2354,22	-
Concentração (mg.L⁻¹)	trifluralin	glyphosate	s-metolachlor	oxifluorfen
Limite inferior	483,80	402,84	381,27	266,93
CE (I)50;7d	600,33	469,63	432,27	317,75
Limite superior	745,44	547,53	490,20	378,36
Concentração (mg.L⁻¹)	clomazone	paraquat	fluazifop-p-butyl	amônio-glufosinato
Limite inferior	73,93	81,57	45,67	26,79
CE (I)50;7d	101,52	93,98	58,14	35,90
Limite superior	140,57	108,18	74,10	48,44

De acordo com a CE (I)50;7d obtidas nos testes de toxicidade aguda, os herbicidas amicarbazone, MSMA, 2,4-D amina e imazethapyr foram classificados como moderadamente tóxicos para *A. cassiae*. Os herbicidas trifluralin, glyphosate, s-metolachlor, oxifluorfen e clomazone foram classificados como muito tóxicos e os herbicidas paraquat, fluazifop-p-butyl e amônio-glufosinato classificados como extremamente tóxicos (Figura 1A, B e C).

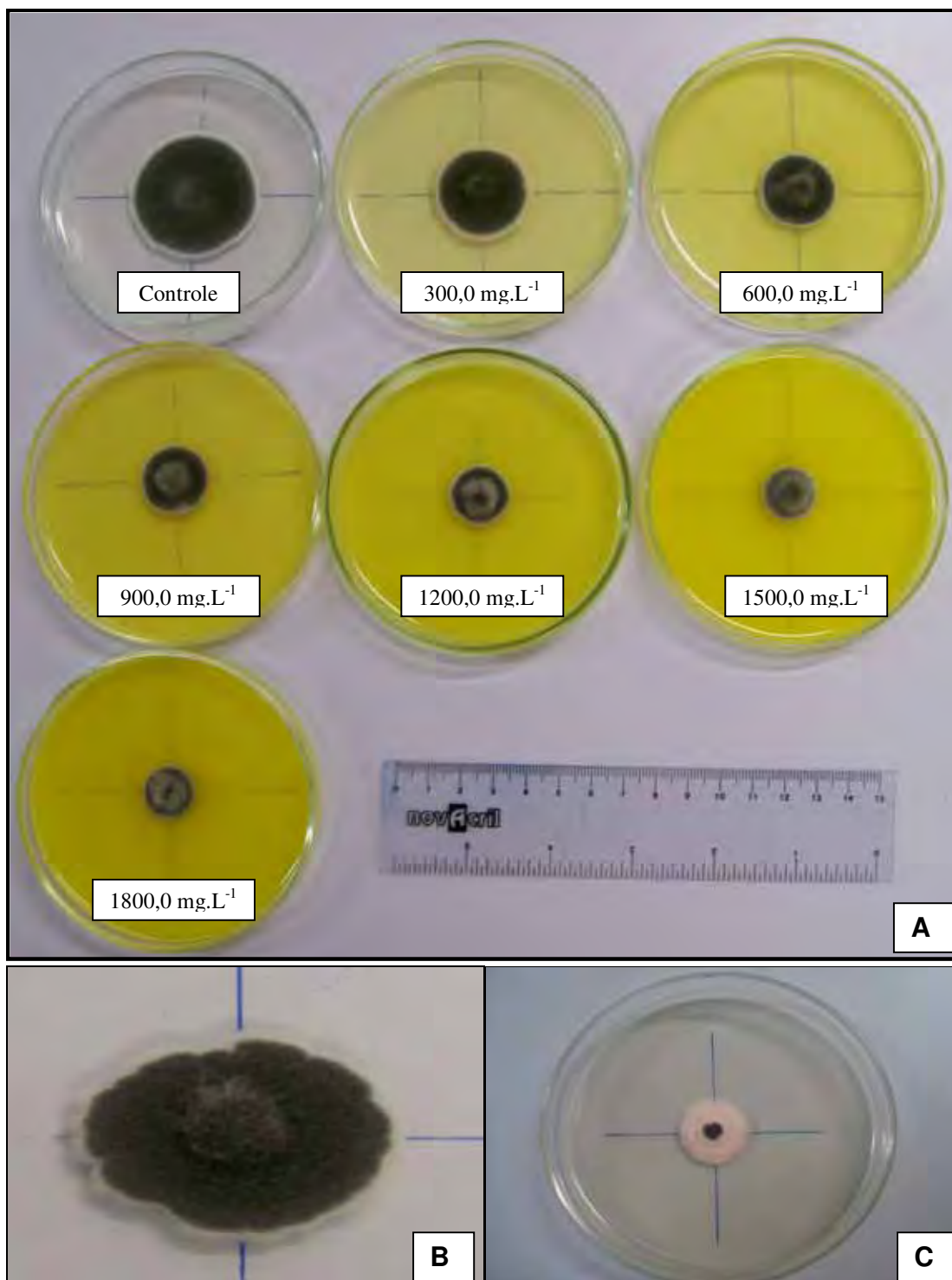


Figura 1. Fotografias do fungo *Alternaria cassiae* expostos a herbicidas: (A) Resposta de inibição do crescimento ao final do teste de toxicidade para trifluralin; (B) inibição do crescimento na concentração de 25,0 mg.L⁻¹ para fluzifop-p-butyl; (C) inibição do crescimento na concentração de 2000,0 mg.L⁻¹ para 2,4-D amina.

Os resultados de porcentagem de inibição de crescimento do fungo *A. cassiae* exposto aos herbicidas foram submetidos ao ajuste da concentração-efeito pela curva sigmoidal de Boltzmann e divididos em três figuras que representam os herbicidas menos tóxicos (Figura 2), os produtos com toxicidade intermediária (Figura 3) e os herbicidas muito tóxicos (Figura 4).

Os herbicidas MSMA, 2,4-D amina e imazethapyr apresentaram as menores porcentagens médias de inibição de crescimento 67, 59, 51%, respectivamente nas maiores concentrações (2500,0 mg.L⁻¹). O amicarbazone não inibiu o crescimento da colônia fúngica em nenhuma das concentrações utilizadas e não se ajustou ao modelo sigmoidal. Para os demais herbicidas o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,95 para MSMA; de 0,85 para imazetapyr; e de 0,96 para 2,4-D amina (Figura 2).

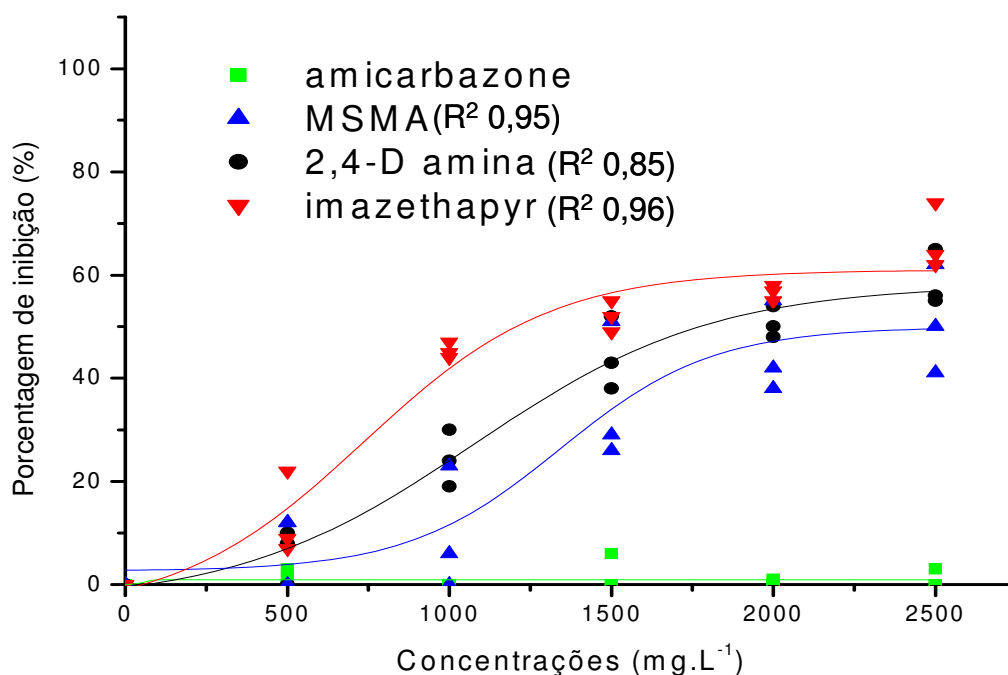


Figura 2. Curva sigmoidal da relação concentração-efeito da inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para os herbicidas considerados menos tóxicos.

Para os herbicidas trifluralin, glyphosate, s-metolacloor e oxifluorfen a curva sigmoidal proporcionou ótimo ajuste com coeficiente de determinação (R^2) de 0,99;

0,98; 0,96; e 0,99, respectivamente. A resposta do fungo a exposição destes herbicidas foi similar, ou seja, inicialmente ocorreu um acréscimo linear na inibição crescimento da colônia com o aumento da concentração até 600,0 mg.L⁻¹ para oxifluorfen, 800,0 mg.L⁻¹ para s-metolachlor, 900,0 mg.L⁻¹ para trifluralin e 1000,0 mg.L⁻¹ para glyphosate e a partir destas concentrações ocorreu uma resposta estável, não ocorrendo aumento na inibição do crescimento com o aumento das concentrações utilizadas (Figura 3).

A máxima inibição de crescimento da colônia fúngica para o herbicida trifluralin foi de 75% na maior concentração utilizada (1800,0 mg.L⁻¹), para o oxifluorfen e s-metolachlor foi de 82% na concentração de 1200,0 mg.L⁻¹ e para o glyphosate foi de 88% na concentração de 1600,0 mg.L⁻¹ (Figura 3).

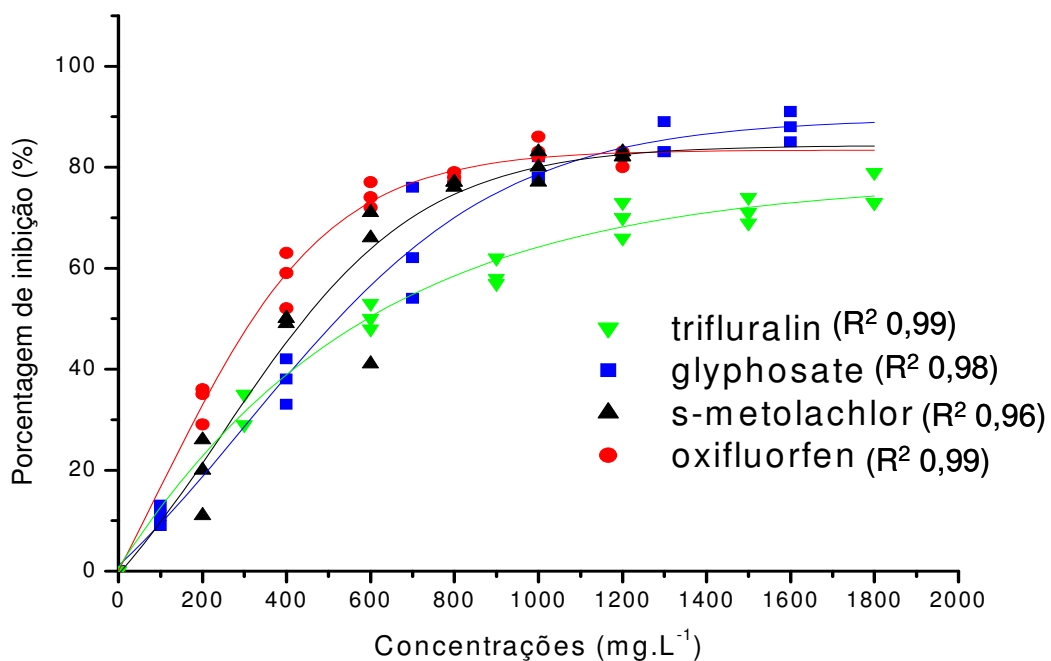


Figura 3. Curva sigmoideal de concentração-efeito da inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para os herbicidas considerados medianamente tóxicos.

O modelo de ajuste da curva sigmoideal também pode ser empregado para os herbicidas clomazone, fluazifop-p-butyl, amônio-glufosinato e paraquat com coeficiente de determinação de 0,97; 0,96; 0,93; e 0,98, respectivamente. Estes herbicidas foram os mais tóxicos para *A. cassiae*. A inibição de crescimento para o clomazone de 94%

com 500,0 mg.L⁻¹, para o fluazifop-p-butyl de 94% com 400,0 mg.L⁻¹, para o paraquat de 93% com 300,0 mg.L⁻¹ e para o amônio-glufozinato de 89% com 200,0 mg.L⁻¹ (Figura 4).

Para *Alternaria alternata* e *Alternaria mali* expostos a óleos essenciais de *Citrus sinensis*, ocorreu inibição de 8,6 e 10,2% na concentração 25 mg.L⁻¹, respectivamente, e inibição total de crescimento com 600 mg.L⁻¹ para *A. alternata* e com 500 mg.L⁻¹ para *A. mali*. Segundo os autores, este óleo pode ser utilizado como fungicida no “manejo pós-colheita” de produtos perecíveis (Sharma & Tripathi, 2006).

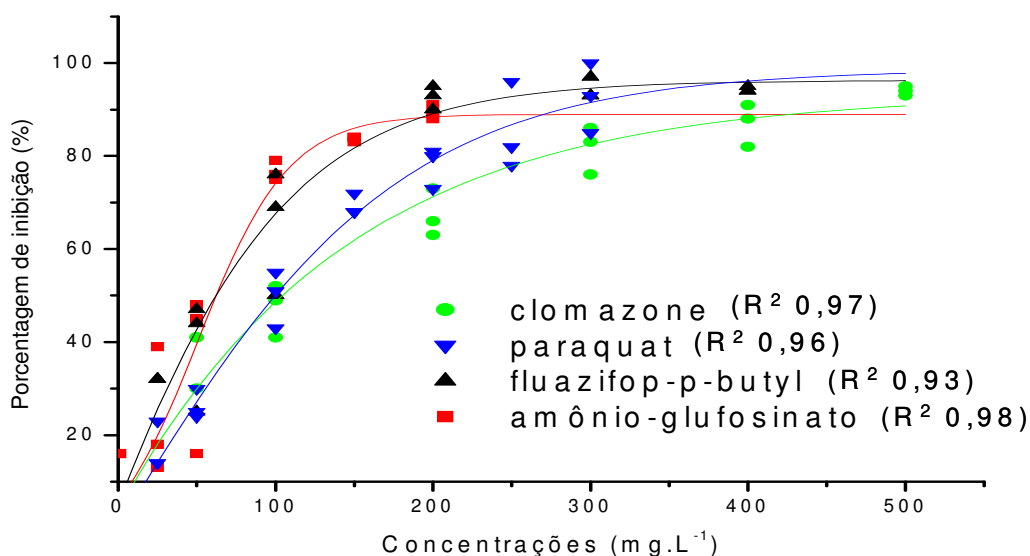


Figura 4. Curva sigmoidal de concentração-efeito da inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para os herbicidas considerados tóxicos.

A capacidade metabólica do fungo é influenciada pela quantidade e pelo tempo de exposição à substância. O fungo *Fusarium oxysporum* exposto a 300 mg.L⁻¹ de substâncias húmicas apresentou 40% de inibição de crescimento, porém a partir de 72 horas de exposição o fungo começa a metabolizar e utilizar esta substância para estimular seu crescimento. Na exposição a 100 mg.L⁻¹ não ocorre inibição no seu crescimento inicialmente, porém após 132 horas ocorre um acréscimo de 10% em sua taxa de crescimento do fungo (Loffredo *et al.*, 2007). Estas respostas de metabolismo e tempo de exposição não foram observadas para o fungo *A. cassiae* para os herbicidas estudados.

Com relação à avaliação de risco ambiental, o herbicida amicarbazone, tanto no melhor quanto no pior cenário, o 2,4-D amina e o glyphosate no melhor cenário (menor dose de registro) e o imazethapyr no único cenário (uma única dose de registro) não apresentaram risco ambiental (nenhum efeito adverso) para o organismo bioindicador *Alternaria cassiae* (Tabela 5).

Os herbicidas glyphosate e 2,4-D amina no pior cenário e todos os demais herbicidas em qualquer que for o cenário apresentaram possibilidade de efeito adverso ao meio ambiente (Tabela 5).

Tabela 5. Análise do risco ambiental dos herbicidas para o fungo *Alternaria cassiae*.

HERBICIDAS	CAE ¹ (mg/m ²)	Risco ambiental (Q ²)
amicarbazone	105,0	0,0420
	140,0	0,0560
amônio-glufosinato	50,0	1,3928
	60,0	1,6713
clomazone	90,0	0,8865
	110,0	1,0835
2,4-D amina	80,6	0,0437
	241,8	0,1310
fluazifop-p-butyl	12,5	0,2150
	25,0	0,4300
glyphosate	24,0	0,0511
	240,0	0,5110
imazethapyr	10,6	0,0048
MSMA	192,0	0,1457
	288,0	0,2185
oxifluorfen	48,0	0,1511
	120,0	0,3777
paraquat	30,0	0,3192
	40,0	0,4256
s-metolachlor	144,0	0,3331
	192,0	0,4442
trifluralin	180,0	0,2998
	360,0	0,5997

¹Concentração ambiental estimada; ²Q=CAE/CE50.

CONCLUSÃO

O fungo *A. cassiae* apresentou um excelente padrão de resposta para os herbicidas avaliados, exceto para o amicarbazone, portanto este organismo pode ser empregado em testes ecotoxicológicos para esta classe de agrotóxicos.

Os herbicidas paraquat, fluazifop-p-butyl e amônio-glufosinato são extremamente tóxicos para o fungo *A. cassiae*. O trifluralin, glyphosate, s-metolachlor, oxifluorfen e clomazone são muito tóxicos, e o amicarbazone, MSMA, 2,4-D amina e imazethapyr, moderadamente tóxicos.

Os herbicidas amicarbazone e imazethapyr nos dois cenários avaliados e o 2,4-D amina e o glyphosate quando utilizados nas menores doses não apresentam nenhum efeito adverso ao meio ambiente, enquanto que, o amônio-glufosinato, clomazone, fluazifop-p-butyl, MSMA, oxifluorfen, paraquat, s-metolachlor, trifluralin em qualquer cenário testado apresentaram possibilidade de efeito adverso ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANANYEVA, N.D., SUSYAN, E.A., CHERNOVA, O.V., CHERNOV, I.Yu. & MAKAROVA, O.L., The ratio of fungi and bacteria in the biomass of different types of soil determined by selective inhibition. *Microbiology*, 75:(6), 2006, 702-707.
- DHINGAR, O.D. & SINCLAIR, J.B., *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985, 355p.
- FERREIRA, C. R. R. P. T., VEGRO, C. L. R. & CAMARGO, M. L. B., Defensivos Agrícolas: expectativa de aumento da demanda em 2007. *Análises e indicadores do Agronegócio*, 2:(7), 2007, 1-10.
- HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C. & THURSTON.V., Trimed Spearman-Kärber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v.7, 1977, 714-719.
- IBAMA, *Avaliação da toxicidade aguda para peixes. Parte D. 3. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos*. Brasília, DF, 1987, 23p.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo agropec., Rio de Janeiro, p.1-146, 2006.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, Levant. Sistem. Prod. Agríc. Rio de Janeiro v.17 Supl. p.1-14 Dez. 2007.
- JENKINSON, D.S. & LADD, J.N., Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A. & LADD, J.N., eds., *Soil Biol. Biochem.*, 5: 1981, 415-471.
- JURAIR, A.M.N. & KHAN, A., A new species of *Alternaria* on *Cassia holsericea*. *Fresen. Pak. J. Sci. Ind. Res.*, Karachi, v.3, 1960, 71-72.
- LOFFREDO, E., BERLOCO, M., CASULLI, F. & SENESI, N., In vitro assessment of the inhibition of humic substances on the growth of two strains of *Fusarium oxysporum*. *Biol. Fertil. Soils*, 43: 2007, 759-769.
- MOURÃO, S.A., VILELA, E.F., ZANUNCIO, J.C., ZAMBOLIM, L. & TUELHER, E.S., Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *Neotropical Entomology*, nº 32, v.1, 2003, 103-106.

ROBERTS, B. & DOROUGH, w. Relative toxicities of chemicals to eartworm *Eisenia foetida*. *Environ. toxicol. Chem.* V.3 n. 1, 1984, 67-78.

SHARMA, N. & TRIPATHI, A., Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology*, 22: 2006, 587-593.

SINDAG, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola, dados de mercado 2006, www.sindag.com.br acesso em abril de 2008.

URBAN, D.J. e COOK, N.J. Hazard evaluation division – Standard evaluation procedure ecological risk assessment. Washington, USEPA Publication 540/9-86-001, 96p. 1986.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E., *Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações*. RIMA, São Carlos, 2008. 478p

CAPÍTULO 4 - TOXICIDADE AGUDA E CLASSIFICAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DE FUNGICIDAS PARA O FUNGO *Alternaria cassiae*

RESUMO - Os fungicidas são utilizados para o controle de fungos patogênicos de diversas culturas, porém podem erradicar ou influenciar uma grande diversidade de microrganismos do solo, considerados como organismos não-alvos. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade aguda e avaliar o risco ambiental dos fungicidas captana, tebuconazol, clorotalonil + cloridrato de propamocarbe para o fungo *Alternaria cassiae*. Para cada fungicida foram realizados três testes definitivos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. A avaliação do crescimento foi diária. A concentração efetiva média estimada (CE (I)50;7d) média foi de 47,36 mg.L⁻¹ para o captana, de 3,49 mg.L⁻¹ para o tebuconazole e de 64,04 mg.L⁻¹ para a mistura clorotalonil + cloridrato de propamocarbe para o fungo *A. cassiae*. O captana e a mistura comercial de clorotalonil + cloridrato de propamocarbe são extremamente tóxicos, e o tebuconazol super tóxico para o fungo, pois causa severa inibição no crescimento e desenvolvimento deste microorganismo. Os três fungicidas testados apresentaram possibilidade de efeito adverso ao meio ambiente.

Palavras chave: ambiente terrestre, fungo, microorganismo, toxicidade, xenobióticos

ACUTE TOXICITY AND CLASSIFICATION OF ENVIRONMENTAL RISK OF FUNGICIDES FOR THE FUNGY *Alternaria cassiae*

SUMMARY - The fungicides are used to control pathogenic fungus of diverse cultures, but they can eradicate or influence a wide range of soil micro-organisms, considered as non-target organisms. Thus, this work aimed to determine the acute toxicity and assess the environmental risk of fungicide captane, tebuconazole, chlorothalonil + propamocarb hydrochloride for the fungus *Alternaria cassiae*. For each fungicide were made three final tests in a completely randomized design with three repetitions. The assessment of growth was daily. The estimated average effective concentration (EC (I) 50;7d) average was 47.36 mg.L⁻¹ to captane, 3.49 mg.L⁻¹ to tebuconazole and 64.04 mg.L⁻¹ to mixing chlorothalonil + hydrochloride propamocarbe for the fungus *A. cassiae*. The captane and commercial mixture of chlorothalonil + propamocarb hydrochloride were classified as extremely toxic. The tebuconazole was classified as super toxic for fungus causing a severe inhibition on growth and development of this microorganism. The three fungicides showed the possibility of adverse effect on the environment.

Key words: terrestrial environment, fungus, microorganismic toxicity, xenobiotics

INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são utilizados durante os ciclos das culturas para controlar organismos danosos às plantas cultivadas. A maioria é aplicada na parte aérea das plantas, porém, um grande percentual destes produtos pode atingir o solo ou são excretados pelas raízes das plantas que receberam a aplicação na parte aérea (Vyas *et al.*, 1988).

Os fungicidas são utilizados para o controle de fungos patogênicos que atuam sobre as plantas das culturas de interesse comercial e podem erradicar ou influenciar uma grande diversidade de microrganismos do solo (Edwards & Bater, 1990) e causar efeitos adversos no crescimento e na atividade de microrganismos benéficos do solo (Ramakrishna-Parama *et al.*, 1997).

A microbiota do solo é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos e pela ciclagem de nutrientes dentro do solo e exerce influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem do carbono e nutrientes minerais (Jenkinson & Ladd, 1981).

A avaliação do efeito dos agrotóxicos no estabelecimento e na sobrevivência dos fungos do solo é importante, pois esses organismos são os decompositores primários da matéria orgânica. Os solos com conteúdo fúngico desequilibrado podem exibir problemas com as taxas de decomposição e mineralização, quantidade, forma e variedade de nutrientes, capacidade de retenção de água e resistência à erosão (Stahl & Parkins, 1999).

As avaliações de risco são baseadas em uma série de informações das substâncias xenobióticas que envolve propriedades químicas e físicas e a atividade biológica. Para as informações sobre as atividades biológicas são realizados vários estudos incluindo os testes ecotoxicológicos (Zagatto & Bertolotti, 2008).

A classe dos fungicidas, agrotóxicos usados no controle de doenças nas culturas, representa 12,4% de todos os produtos comerciais vendidos no Estado de São Paulo, com o valor de US\$ 133,9 milhões (SINDAG, 2006).

Assim, a sustentabilidade, os nutrientes e a microbiologia dos solos são influenciados pela utilização destes produtos. Deste modo, as avaliações de riscos

destas substâncias devem ser cada vez mais abrangentes e contemplar o principal patrimônio da agricultura, o solo fértil e sadio. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade aguda dos fungicidas captana, tebuconazol, clorotalonil + cloridrato de propamocarbe para o fungo *Alternaria cassiae* e avaliar o risco ambiental destes agrotóxicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do fungo

A cepa do fungo *A. cassiae* utilizado no experimento foi fornecido pelo Laboratório de Controle Biológico de Plantas Daninhas do CENARGEN/EMBRAPA e está armazenado na micoteca do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Método de cultivo

Para o cultivo foi utilizando o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Para a preparação de um litro de meio foram utilizados 200 g de batata, 20 g de dextrose e 15 g de ágar (Dhingar & Sinclair, 1985).

A batata foi descascada e colocada para cozinhar por dez minutos. Após o cozimento, foi realizada a filtragem do caldo de cozimento. A seguir, foram adicionados 20 g de dextrose e homogeneizado por três minutos. Esta mistura foi transferida para um frasco erlenmeyer com 15 g de ágar. Estes foram autoclavados a 120°C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos.

Após este processo, o meio foi vertido em placas de Petri de vidro com 14 cm de diâmetro para a sua solidificação. A seguir, foi colocado um disco da colônia fúngica com 6,5 mm de diâmetro de *A. cassiae* no centro de cada placa. O disco foi retirado da região de crescimento ativo da colônia. As placas foram incubadas em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD) a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, por 20 dias. O

cultivo do fungo foi realizado semanalmente, com o objetivo de se obter colônias em atividade de crescimento para serem utilizadas nos testes de toxicidade aguda.

Seleção dos fungicidas

Para a avaliação da toxicidade aguda nos testes ecotoxicológicos, foram selecionados dois fungicidas captana (Captan SC 480 g.L⁻¹) e tebuconazol (Orius 250EC 250 g.L⁻¹) registrados para o controle de alguma espécie de *Alternaria* e uma mistura comercial de clorotalonil + cloridrato de propamocarbe (Tattoo C 375 + 375 g.L⁻¹) com ampla utilização e toxicidade (Brasil, 2003).

O fungicida captana é classificado como extremamente tóxico (classe I). Na cultura do feijão é indicado para o controle da doença Mancha-de-*Alternaria* causada pelo fungo *Alternaria sp.* (Brasil, 2003).

O tebuconazol é classificado como medianamente tóxico (classe III). Nas culturas da batata, cebola e do tomate é indicado para o controle doenças causadas pelos fungos *Alternaria solani* e *Alternaria porri* (Brasil, 2003).

A mistura clorotalonil + cloridrato de propamocarbe é classificada como extremamente tóxico (classe I). Nas culturas de batata e tomate, esta mistura é indicada para o controle das doenças causadas pelo fungo *Phytophthora infestans* (Brasil, 2003).

Toxicidade dos fungicidas para o fungo *Alternaria cassiae*

Inicialmente, foram realizados testes preliminares de toxicidade aguda com os fungicidas para a determinação dos intervalos de concentração que causam zero e 100% de inibição no crescimento do fungo *Alternaria cassiae* conforme metodologia adaptada do IBAMA (1987). A avaliação da sensibilidade do fundo foi realizada por testes periódicos de toxicidade aguda utilizando a substância de referência dicromato de potássio.

Para cada fungicida foram realizados três testes definitivos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

As concentrações (mg.L⁻¹) utilizados nos testes definitivos foram: para captana 0,0; 1,0; 10,0; 50,0; 90,0; 130,0; e 170,0; para tebuconazol 0,0; 1,0; 10,0; 20,0; 30,0;

40,0; e 50,0; e para a mistura clorotalonil + cloridrato de propamocarbe 0,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; e 300,0.

Para a realização dos testes foi preparado o meio BDA com redução de 10% no seu volume final de água. Este procedimento foi adotado, para permitir a diluição do fungicida no meio sem perder a concentração desejada.

Em uma câmara de fluxo laminar (VECO®) foram preparadas as soluções de diluição dos fungicidas e a seguir foram adicionadas ao meio de cultura na temperatura de $\pm 50^{\circ}\text{C}$ na proporção (1:9; v/v), ou seja, 10 vezes o valor da concentração final do meio para a manutenção da concentração desejada.

A seguir, o meio com o fungicida foi vertido em placas de Petri de vidro com 9 cm de diâmetro. Após a solidificação do meio de cultura foi colocado um disco de 6,5 mm de diâmetro de *A. cassiae*, retirado da região ativa de uma colônia. As placas inoculadas foram vedadas com filme plástico e transferidas para uma estufa (BOD) a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. O período de incubação foi de sete dias.

A avaliação do crescimento do fungo foi realizada diariamente por meio de medição do diâmetro em dois eixos perpendiculares e subtração de 6,5 mm como fator de correção, correspondente ao diâmetro inicial.

Para cada concentração foram estimadas as porcentagens de inibição no crescimento (IC) radial do micélio do fungo com a equação:

$$IC(\%) = \left(1 - \frac{DMCP}{DMCC}\right) * 100$$

Sendo:

IC = inibição do crescimento;

DMCP = diâmetro médio das colônias expostas ao produto;

DMCC = diâmetro médio das colônias controle.

Esta fórmula de avaliação de inibição do crescimento também foi utilizada por Mourão *et al.* (2003) para verificar o desenvolvimento de colônias do fungo *Beauveria bassiana*.

Os valores da concentração efetiva (CE (I)50;7d) e seus limites inferior e superior foram estimados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977). Todos os cálculos estatísticos foram realizados pelo programa computacional estatístico “EC50 GWbasic Test”.

A toxicidade Aguda dos fungicidas foi classificada conforme a metodologia para organismos terrestres adaptada de Roberts & Dorough (1984) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da toxicidade aguda para organismos terrestres, adaptado de Roberts & Dorough, (1984).

EC 50 (mg/m ²)	Classificação
CE ≥ 10000	Praticamente não tóxico
1000 ≤ CE < 10000	Moderadamente tóxico
100 ≤ CE < 1000	Muito tóxico
10 ≤ CE < 100	Extremamente tóxico
CE < 10	Super tóxico

A avaliação do risco ambiental para o fungo *A. cassiae* foi baseada no com o cálculo da concentração ambiental estimada (CAE), no pior cenário (maior dose recomendado prevista no registro) e no melhor cenário (menor dose recomendada) para os fungicidas.

A classificação do risco ambiental foi realizada pelo método do quociente (Q), obtido pela divisão da concentração ambiental estimada (CAE) pelos valores de concentração efetiva (CE (I)50;7d). As classes de risco ambiental utilizadas foram as descritas por Urban & Cook (1986).

- Nenhum efeito adverso ($Q \leq 0,1$);
- Possibilidade de efeito adverso ($0,1 \leq Q \leq 10$);
- Probabilidade de efeito ($Q > 10$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração efetiva média estimada da toxicidade aguda CE (I)50;7d para a *A. cassiae* foi de 47,36 mg.L⁻¹ para o captana, de 3,49 mg.L⁻¹ para o tebuconazole e de 64,04 mg.L⁻¹ para a mistura clorotalonil + cloridrato de propamocarbe (Tabela 3). A CE (I)50;14d do tebuconazol foi similar à obtida para o fungo *Beauveria bassiana*, com concentração efetiva de 1,0 mg.L⁻¹ (Mourão *et al.*, 2003).

Tabela 2. Média da concentração efetiva 50% (EC (I)50;7d), do limite superior e inferior dos fungicidas.

captana	Número de teste			Média
	1	2	3	
Limite inferior	48,44	37,81	25,99	37,41
CE (I)50;7d	60,00	44,98	37,00	47,36
Limite superior	74,57	53,53	52,79	60,29
tebuconazol	1	2	3	Média
Limite inferior	2,95	2,95	1,33	2,41
CE (I)50;7d	3,98	4,14	2,37	3,49
Limite superior	5,38	5,81	4,23	5,14
clorotalonil + cloridrato de propamocarbe	1	2	3	Média
Limite inferior	51,06	52,58	30,59	44,74
CE (I)50;7d	66,73	80,04	45,37	64,04
Limite superior	87,22	121,84	67,32	92,12

O fungicida captana e a mistura comercial de clorotalonil + cloridrato de propamocarbe foram classificados como extremamente tóxicos e o tebuconazol, como super tóxico para *A. cassiae*.

Os resultados de porcentagem de inibição de crescimento do fungo aos fungicidas foram submetidos ao ajuste da concentração-efeito pela curva sigmoidal de Boltzmann (Figura 1A, B e C).

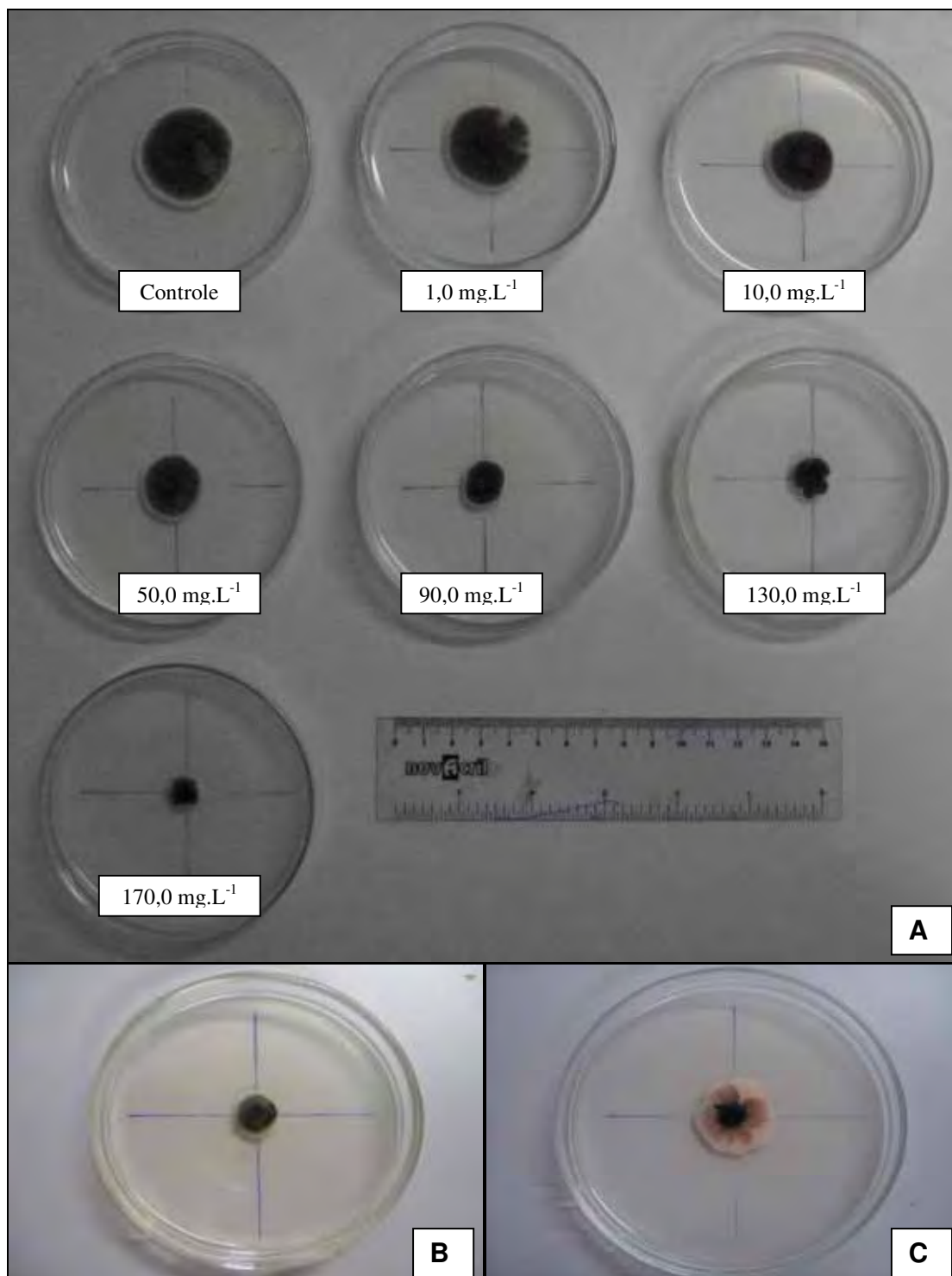


Figura 1. Fotografias do fungo *Alternaria cassiae* expostos aos fungicidas: (A) Resposta de inibição do crescimento ao final do teste de toxicidade para captana; (B) inibição do crescimento na concentração de 10,0 mg.L⁻¹ de tebuconazol; (C) inibição do crescimento na concentração de 50,0 mg.L⁻¹ de clorotalonil + cloridrato de propamocarbe.

O captana apresentou inibição de crescimento de 8% em $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$; 14% em $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$; 50% em $50,0 \text{ mg.L}^{-1}$; 64% em 90 mg.L^{-1} ; 76% em 130 mg.L^{-1} ; e de 81% em 170 mg.L^{-1} . O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,96, onde constata-se um ótimo ajuste da curva (Figura 2). Para este fungicida ocorreu uma tendência de estabilização do efeito sobre o crescimento da colônia fúngica para as concentrações acima de 130 mg.L^{-1} (Figura 2).

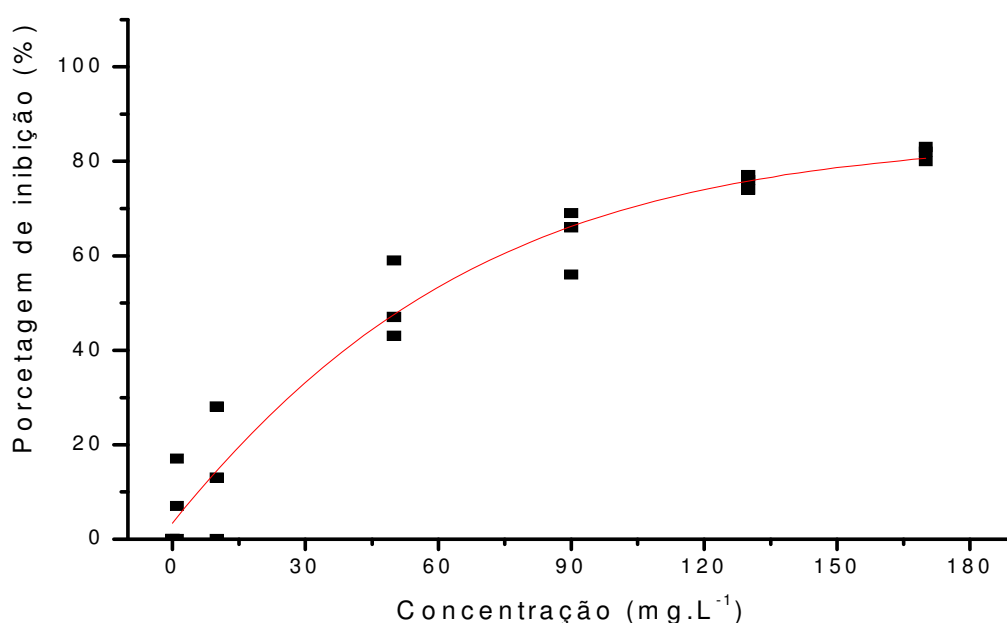


Figura 2. Curva sigmoideal da relação concentração-efeito na inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para o fungicida captana.

Para o tebuconazol, a curva sigmoideal proporcionou ótimo ajuste com coeficiente de determinação (R^2) de 0,96 e apresentou uma tendência de estabilização de resposta do fungo a partir de $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$. As porcentagens médias de inibição foram 26% com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$; 71% com $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$; 77% com $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$; 85% com $30,0 \text{ mg.L}^{-1}$; 86% com $40,0 \text{ mg.L}^{-1}$; e 83% com $50,0 \text{ mg.L}^{-1}$ do fungicida (Figura 3).

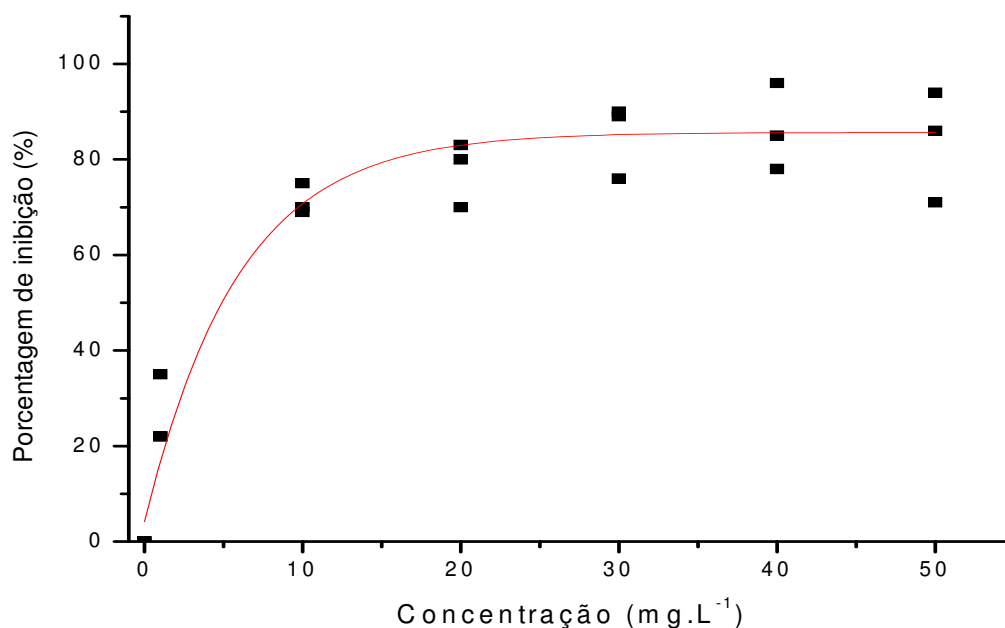


Figura 3. Curva sigmoideal da relação concentração-efeito na inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para o tebuconazol.

Para a mistura clorotalonil + cloridrato de propamocarbe, o ajuste da curva sigmoideal também foi ótimo, com coeficiente de determinação de 0,92 (Figura 4). Para este fungicida foi estimada a menor CE (I)50;7d para o fungo *Alternaria cassiae* (Tabela 2), porém a resposta inicial do fungo foi rápida, sendo que a partir de 100 mg.L⁻¹ ocorreu uma tendência de estabilização na resposta do fungo.

As porcentagens médias de inibição foram de 36% com 25 mg.L⁻¹; de 49% com 50 mg.L⁻¹; de 57% com 100 mg.L⁻¹; de 60% com 150 mg.L⁻¹; de 69% com 200 mg.L⁻¹ e com 250 mg.L⁻¹; e de 73% com 300 mg.L⁻¹ da mistura clorotalonil + cloridrato de propamocarbe (Figura 4).

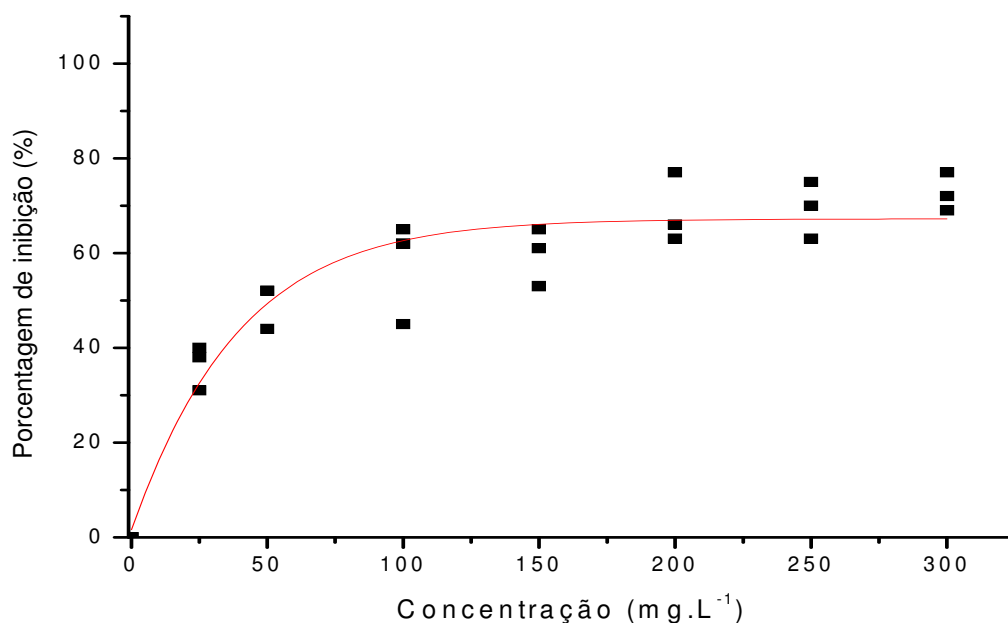


Figura 4. Curva sigmoideal da relação concentração-efeito na inibição de crescimento do fungo *Alternaria cassiae* para a mistura dos fungicidas clorotalonil + cloridrato de propamocarbe.

Para *Pyricularia grisea* e *Colletotrichum lindemuthianum* expostos por quatro dias ao detergente a base de óleo de mamona ocorreu inibição total do crescimento com 100 e 50 mg.L⁻¹, respectivamente. Porém a partir de oito dias de exposição a porcentagem de inibição do fungo *P. grisea* diminuiu para a faixa de 84%. Para o *Fusarium graminearum* exposto a 300 mg.L⁻¹ inibiu 91% do crescimento (Takano *et al.*, 2007).

Para todos os fungicidas testados (captana, tebuconazol, clorotalonil + cloridrato de propamocarbe) tanto no melhor cenário (menor dose registrada para a utilização do produto) quanto no pior cenário (maior dose registrada para a utilização do produto) apresentaram possibilidade de efeito adverso (Tabela 3) para o organismo bioindicador *Alternaria cassiae*, segundo a classificação descrita por Urban & Cook (1986).

Tabela 3. Análise do risco ambiental dos fungicidas para o fungo *Alternaria cassiae*.

FUNGICIDAS	CAE ¹ (mg/m ²)	Risco ambiental (Q ²)
captana	12,0	0,2534
	120,0	2,5338
tebuconazol	10,0	2,8653
	15,0	4,2980
clorotalonil + cloridrato de propamocarbe	187,5	2,9279
	262,5	4,0990

¹Concentração ambiental estimada; ²Q=CAE/CE50.

CONCLUSÃO

O fungicida captana e a mistura comercial de clorotalonil + cloridrato de propamocarbe são extremamente tóxicos e o tebuconazol super tóxico para *A. cassiae*. Esta classe de agrotóxico apresenta grande problema para os microorganismos não alvo presentes no solo.

Os fungicidas testados captana, tebuconazol, clorotalonil + cloridrato de propamocarbe apresentaram possibilidade de efeito adverso ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brasil (MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS). Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit), 2003 < http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons > acesso em: 20 de abril de 2008.
- DHINGAR, O.D. & SINCLAIR, J.B., *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985, 355p.
- EDWARDS, C. A., BATER, J. E., An evaluation of laboratory and field studies for the assessment of the environmental effects of pesticides. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE ON PESTS AND DISEASES, 1990, Brighton. Proceedings... Brighton: British Crop Protection Council, 1990. p. 963-968.
- FERREIRA, C. R. R. P. T., VEGRO, C. L. R. & CAMARGO, M. L. B., Defensivos Agrícolas: expectativa de aumento da demanda em 2007. *Análises e indicadores do Agronegócio*, 2:(7), 2007, 1-10.
- HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C. & THURSTON.V., Trimed Spearman-Kärber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v.7, 1977, 714-719.
- IBAMA, *Avaliação da toxicidade aguda para peixes. Parte D. 3. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos*. Brasília, DF, 1987, 23p.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo agropec., Rio de Janeiro, 2006, p.1-146.
- JENKINSON, D.S. & LADD, J.N., Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A. & LADD, J.N., eds., *Soil Biol. Biochem.*, 5: 1981, 415-471.
- MOURÃO, S.A., VILELA, E.F., ZANUNCIO, J.C., ZAMBOLIM, L. & TUELHER, E.S., Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *Neotropical Entomology*, nº 32, v.1, 2003, 103-106.
- ROBERTS, B. & DOROUGH, w. Relative toxicities of chemicals to earthworm *Eisenia foetida*. *Environ. toxicol. Chem.* V.3 n. 1, 1984, 67-78.
- SINDAG, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola, dados de mercado 2006, www.sindag.com.br acesso em abril de 2008.

TAKANO, E. H., BUSSO, C., GONÇALVES, E. A. L., CHIERICE, G. O., CATANZARO-GUIMARÃES, S. A. & CASTRO-PRADO, M. A. A. de, Inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por detergente derivado de óleo da mamona (*Ricinus communis*). *Ciência Rural*, v. 37, n. 5, 2007, 1235-1240

URBAN, D.J. e COOK, N.J. Hazard evaluation division – Standard evaluation procedure ecological risk assessment. Washington, USEPA Publication 540/9-86-001, 1986, 96p.

VYAS, S. C., Soil microorganisms and their activities. In: VYAS, S. C. (Ed.) *Non-target effects of agricultural fungicides*. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 131-160.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E., *Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações*. RIMA, São Carlos, 2008. 478p.

ANEXO 1

Carta controle

A carta controle é o mecanismo que regula a qualidade e a sensibilidade dos organismos utilizados nos testes de toxicidade aguda realizados no laboratório, sendo que resultados que fiquem fora dos limites de controle (superior e/ou inferior) devem ser desconsiderados (Figura 1).

Tabela 1. Concentração Efetiva 50% (CE (I)50;7d), limite superior, limite inferior e coeficiente de variação do dicromato de potássio para o fungo *Alternaria cassiae*.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Testes realizados							Média ±
	1	2	3	4	5	6	7	DP ¹
EC(I) 50-7d	67,08	51,15	77,25	67,61	77,41	59,64	61,67	65,97 ± 9,48
Limite de controle superior (CE (I)50;7d média + 2 x Desvio padrão)								84,95
Limite de controle Inferior (CE (I)50;7d média - 2 x Desvio padrão)								46,99
CV (%)								14,38

Desvio padrão

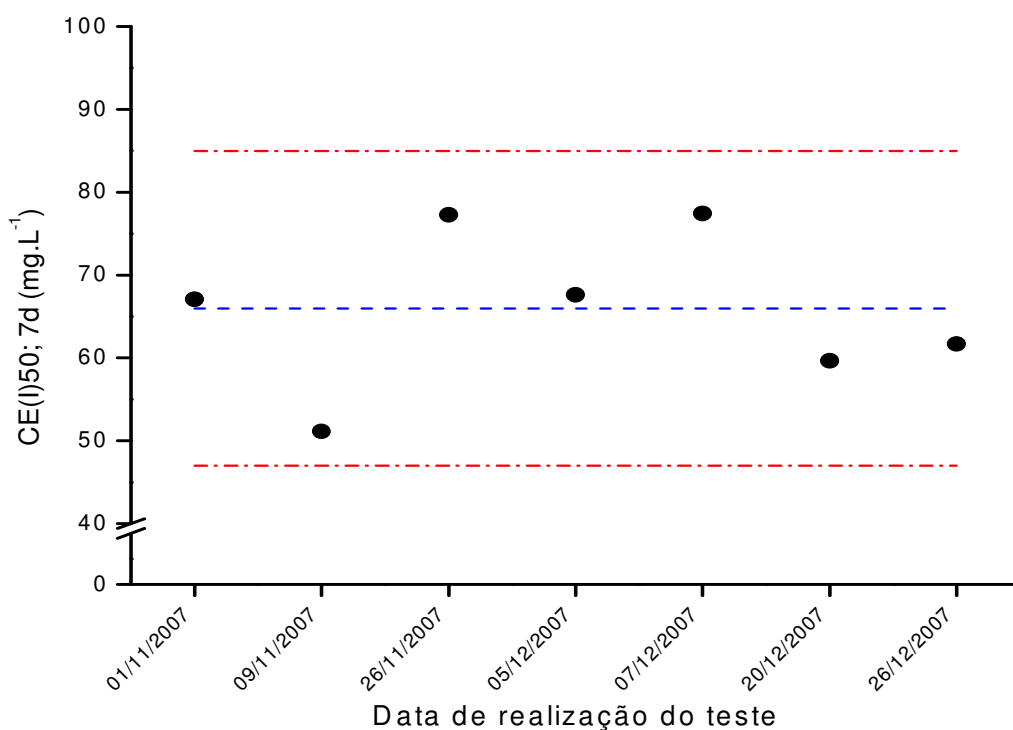


Figura 1. Controle da sensibilidade do fungo *Alternaria cassiae* à substância de referência dicromato de potássio.