



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS ERECHIM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**CARLA ALVES**

**SELEÇÃO DE ESPÉCIES COM POTENCIAL PARA FITORREMEDIAÇÃO DE  
SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOX**

**ERECHIM  
2016**

**CARLA ALVES**

**SELEÇÃO DE ESPÉCIES COM POTENCIAL PARA FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOX**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, sob a orientação do e Prof. D. Sc. Leandro Galon. e Prof<sup>ª</sup> Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin.

ERECHIM  
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

ERS 135, Km 72, nº 200  
Cep: 99.700-970  
Erechim - RS  
Brasil

**DGI/DGCI - Divisão de Gestão de Conhecimento e Inovação**

Alves, Carla  
SELEÇÃO DE ESPÉCIES COM POTENCIAL PARA  
FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDAS  
INIBIDORES DA PROTOX/ Carla Alves. -- 2017.  
103 f.:il.

Orientador: Leandro Galon.  
Co-orientadora: Rosilene Rodrigues Kaizer.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia Ambiental (PPGCTA) , Erechim, RS , 2017.

1. Sulfentrazone. 2. Fomesafen. 3. Carryover. 4.  
Estresse oxidativo. I. Galon, Leandro, orient. II.  
Kaizer, Rosilene Rodrigues, co-orient. III. Universidade  
Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



### Ata de Defesa de Dissertação 016/PPGCTA-2016

Ministério da Educação  
Universidade Federal da  
Fronteira Sul

INFC: 11.234 780/001-20  
950-153, km 73, nº 200  
Fone: (54) 3321 7838  
95700-000 Erechim  
Rm Grande do Sul - Brasil

[www.ufss.edu.br](http://www.ufss.edu.br)

E  
[comproad@ufss.edu.br](mailto:comproad@ufss.edu.br)  
E

Defesa de Dissertação do(a) mestrando(a) Carla Alves, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, perante a Banca Examinadora designada pela Portaria nº 177/PROPEPG/UFSS/2016, de 05 de dezembro de 2016.

Aos quinze dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dezesseis, às quatorze horas, na sala de aula 3, Seminário Nossa Senhora de Fátima, do Campus Erechim, da Universidade Federal da Fronteira Sul, reuniu-se, para defesa da dissertação apresentada por Carla Alves, intitulada: "SELEÇÃO DE ESPÉCIES COM POTENCIAL PARA FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDAS INIBIDORES DE PROTON", a Banca Examinadora designada pela Portaria nº 177/PROPEPG/UFSS/2016, de 05 de dezembro de 2016, composta pelos professores: Prof. Dr. Leandro Galon (UFSS), Prof. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin (IFRS), Prof. Dr. Anderson Luis Nunes (IFRS) e Prof. D.Sc. Siumar Pedro Tironi (UFSS) como membros titulares. E, Prof. Dr. Gismael Francisco Perin (UFSS) como membro suplente. O professor Leandro deu por aberta a sessão e logo a seguir passou a palavra ao (à) mestrando(a), para que em até trinta minutos expusesse seu trabalho. Terminada a exposição, passou-se à arguição da Banca Examinadora. A seguir, a sessão foi suspensa e os examinadores decidiram por (x) aprovar ( ) reprovar o trabalho.

Observações: *Efetuadas as correções sugeridas pela banca*

A Banca orienta que no prazo de 45 dias seja entregue a versão final do trabalho de dissertação à Secretaria Acadêmica. Nestes termos, esta ata segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora e pelo (a) mestrando (a).

Erechim/RS, 15 de dezembro de 2016.

Carla Alves

Prof. Dr. Leandro Galon

Prof. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin

Prof. Dr. Anderson Luis Nunes

Prof. D.Sc. Siumar Pedro Tironi

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

Agradeço minha família e marido pelo carinho, apoio e compreensão

Agradeço meus orientadores pelo apoio e compreensão.

Ao IFRS pelo apoio, por conceder liberação para cursar a capacitação.

Agradecimento especial aos bolsistas de iniciação científica, sem ajuda deles não seria possível a realização deste trabalho: Fábio, Cinthia, Felipe N., Felipe B., Josiel, Luciane, Carlos Orestes, Franciele, Eduarda, Jéssica, Ana Paula, Letícia e Carlos, muito obrigada!

Aos colegas pelo companheirismo e amizade, em especial ao Cesar e Camile pela ajuda e incentivo.

Agradecimento especial a Professora Dr. Luciane A. Tabaldi (UFSM) e equipe pela colaboração e disponibilidade.

## RESUMO

O emprego de espécies vegetais para fitorremediação de solos contaminados com herbicidas torna-se uma alternativa que vem ganhando destaque para minimizar os efeitos da persistência de agrotóxicos no ambiente. Objetivou-se com este trabalho avaliar a tolerância de espécies de inverno e verão aos herbicidas fomesafen e sulfentrazone, para possibilidade de uso como plantas fitorremediadoras de solo contaminado por esses herbicidas. Para alcançar os objetivos propostos, foram conduzidos experimentos em casa de vegetação, na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim. O primeiro experimento, teve por objetivo avaliar a tolerância de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço tratadas com quatro doses dos herbicidas fomesafen e sulfentrazone. O delineamento utilizado foi de blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições. Utilizando-se as espécies (aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço) e com a aplicação em pre-emergência as doses dos herbicidas (fomesafen – 0, 0,125, 0,25 e 0,5 kg ha<sup>-1</sup> e sulfentrazone – 0, 0,3, 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup>). Aos 45 dias após a aplicação dos herbicidas avaliou-se a fitotoxicidade ocasionada às plantas e os efeitos sobre as características relacionadas à fisiologia das plantas. Determinou-se ainda a altura de plantas, diâmetro de caule, a área foliar e a massa seca da parte aérea. Foram coletadas a parte aérea de plantas de aveia preta, ervilhaca, nabo e tremoço acondicionadas em papel alumínio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Estas amostras foram utilizadas na determinação da atividade das enzimas antioxidantes catalase e guaiacol, assim como os níveis de peroxidação lipídica das plantas submetidas aos herbicidas fomesafen e sulfentrazone. O solo proveniente dos ensaios anteriores foi utilizado para a semeadura de pepino, planta usada como bioindicadora da presença ou não dos herbicidas no solo. Aos 7, 14, 21 e 28 dias após a emergência do pepino foram avaliadas a fitotoxicidade causada pelo fomesafen e sulfentrazone. Aos 28 dias determinou-se a altura, diâmetro de caule, a área foliar e a massa seca. O segundo experimento, que teve por objetivo avaliar a tolerância de crotalária, milho, mucuna preta e sorgo tratadas com quatro doses dos herbicidas fomesafen e sulfentrazone. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Utilizando as espécies (crotalária, milho, mucuna preta e sorgo) com a aplicação em pré emergência as doses dos herbicidas (fomesafen – 0, 0,125, 0,25 e 0,5 kg ha<sup>-1</sup> e sulfentrazone – 0, 0,3, 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup>). Aos 30 dias após a aplicação dos herbicidas avaliou-se a fitotoxicidade ocasionada às plantas. Determinou-se ainda altura de plantas, diâmetro de caule, a área foliar e a massa seca da parte aérea. Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, em havendo significância aplicou-se regressões lineares ou não lineares para avaliar o efeito das doses dos herbicidas sobre a espécie estudada. O cornichão foi a espécie menos tolerante aos herbicidas. A aveia preta foi pouco afetada pela aplicação de diferentes doses de fomesafen, porém demonstrou-se altamente suscetível ao sulfentrazone. O nabo apresentou tolerância ao aplicar a dose de 0,25 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen. Para o sulfentrazone essa espécie apresentou tolerância. A espécie mais tolerante ao fomesafen e ao sulfentrazone, independentemente da dose foi o tremoço, de modo que apresenta uma possível alternativa para a fitorremediação de solos tratados com esses herbicidas. A ervilhaca e o nabo também apresentaram potencial remediador do solo, porém, em níveis inferiores ao tremoço. Os herbicidas fomesafen e sulfentrazone promoveram alterações no equilíbrio das plantas gerando estresse oxidativo e induzindo a resposta do sistema antioxidante das plantas, principalmente na dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen, para a ervilhaca e o nabo. Ao mesmo tempo, a dose de 1,2 kg ha<sup>-1</sup> de sulfentrazone gerou um aumento na peroxidação lipídica na ervilhaca, nabo e tremoço. Além disso, aveia preta foi a espécie que demonstrou as mais baixas alterações no sistema antioxidante com a exposição aos herbicidas fomesafen e sulfentrazone. Dentre os herbicidas testados o sulfentrazone apresentou as maiores injúrias sobre o pepino. Quanto aos resultados obtidos no segundo experimento, observou-se que a mucuna preta foi tolerante ao herbicida fomesafen. Até a dose recomendada, 0,25 kg ha<sup>-1</sup> a mucuna preta, o milho, o sorgo e a crotalária apresentaram tolerância ao fomesafen. Entre os herbicidas testados, o sulfentrazone apresentou maior efeito tóxico sobre as espécies,

ocasionando a morte das plantas mesmo com a aplicação da metade das doses. As espécies de inverno aveia preta, ervilhaca, nabo e tremoço, e as espécies verão crotalária, milho, mucuna preta e sorgo, apresentam potencial para fitorremediar solos contaminados com fomesafen e sulfentrazone.

Palavras-chave: Sulfentrazone, Fomesafen, *Carryover*, Estresse Oxidativo

## ABSTRACT

The use of plant species for phytoremediation of soil contaminated with herbicides becomes an alternative that has been emphasizing to minimize the effects of the persistence of agrochemicals in the environment. The objective of this work was to evaluate the tolerance of winter and summer species to the herbicides fomesafen and sulfentrazone, for the possibility of phytoremediation of soil contaminated by these herbicides. In order to reach the proposed objectives, greenhouse experiments were conducted at the Federal University of Southern Frontier, Campus Erechim. The first experiment was carried out to evaluate the tolerance of winter species treated with four doses of the herbicides fomesafen and sulfentrazone. The design was completely randomized, with four replications. Using the species (*Avena sativa*, *Vicia sativa*, *Raphanus sativus*, *Lotus corniculatus*, *Lupinus albus*) and the doses of herbicides (fomesafen - 0, 0.125, 0.25 and 0.5 kg ha<sup>-1</sup> and sulfentrazone - 0, 0.3, 0.6 and 1.2 kg ha<sup>-1</sup>). The second experiment, whose objective was to evaluate the tolerance of summer *Crotalaria juncea*, *Pennisetum glaucum*, *Mucuna puriens* e *Sorghum bicolor*, treated with 4 doses of the herbicides fomesafen and sulfentrazone. The design was completely randomized, with four replications. With the application of herbicides (fomesafen - 0, 0.125, 0.25 and 0.5 kg ha<sup>-1</sup> and sulfentrazone - 0.3, 0.6 and 1.2 kg ha<sup>-1</sup>). At 45 days for the winter species and at 30 days for the summer species, after the application of the herbicides the phytotoxicity of the plants was evaluated. Plant height, stem diameter, leaf area and shoot, dry mass were also determined. At 45 days after application of the herbicides, the effects on the physiological characteristics of the plants were evaluated in winter plants. The aerial part of plants of black oats, vetch, turnip and lupine were packed in foil and immediately frozen in liquid nitrogen. These samples were used to determine the activity of the antioxidant enzymes catalase and guaiacol, as well as the levels of lipid peroxidation of the plants submitted to the herbicides fomesafen and sulfentrazone. Soil from *A. sativa*, *R. sativus*, *V. sativa*, *L. corniculatus*, *L. albus*, and trials was used for sowing cucumber, a plant used as a bioindicator for the presence or absence of herbicides in the soil. Phytotoxicity caused by fomesafen and sulfentrazone were evaluated at 7, 14, 21 and 28 days after cucumber emergence. At 28 days the height, stem diameter, leaf area and dry mass were determined. The data were submitted to analysis of variance by the F test, where linear or non linear regressions were applied to evaluate the effect of herbicide doses on the species studied. The cornichão was the species less tolerant to the herbicides. *A. sativa* were slightly affected by the application of different doses of fomesafen, but were highly susceptible to sulfentrazone. *R. sativus* presented tolerance when applying the 0.25 kg ha<sup>-1</sup> dose of fomesafen. For sulfentrazone this species showed tolerance. The most tolerant species to fomesafen and sulfentrazone, irrespective of the dose, was *L. albus*, so that it presents a possible alternative for the phytoremediation of soils treated with these herbicides. *V. sativa* and *R. sativus* nabo also showed potential for soil remediation, but at levels lower than *L. albus*. As for the results obtained when testing the summer species, it was observed that the *M. puriens* was tolerant to the herbicide fomesafen. Up to the recommended dose, 0.25 kg ha<sup>-1</sup>, *Crotalaria juncea*, *Pennisetum glaucum*, *Mucuna puriens* e *Sorghum bicolor* showed tolerance to fomesafen. Among the herbicides tested, sulfentrazone presented a higher toxic effect on the species, causing the death of plants even with the application of half of the doses. The herbicides fomesafen and sulfentrazone promoted changes in the balance of plants, generating oxidative stress and inducing the response of the plant's antioxidant system, mainly at 0.5 kg ha<sup>-1</sup> of fomesafen, for *V. sativa* and *R. sativus*. At the same time, the dose of 1.2 kg ha<sup>-1</sup> of sulfentrazone generated an increase in lipid peroxidation in *V. sativa*, *R. sativus* and *L. albus*. In addition, aveia preta was the species that showed the lowest changes in the antioxidant system with exposure to the herbicides fomesafen and sulfentrazone. Among the herbicides tested, sulfentrazone presented the highest injuries on cucumber. The winter species *A. sativa*, *V. sativa*, *R. sativus* and *L. albus*, and the species summer *Crotalaria juncea*, *Pennisetum glaucum*, *Mucuna puriens* e *Sorghum bicolor*, present potential for phytoremediation of soils contaminated with fomesafen and sulfentrazone.

Key words: Sulfentrazone, Fomesafen, Carryover, Oxidative Stress

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ANUAIS DE INVERNO A HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOPORFIRINOGENO OXIDASE (PROTOX).....</b>	<b>17</b>
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
LITERATURA CITADA.....	25
<b>TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ANUAIS DE VERÃO A HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOPORFIRINOGENO OXIDASE (PROTOX).....</b>	<b>32</b>
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
LITERATURA CITADA.....	39
<b>CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE PLANTAS HIBERNAIS COM POTENCIAL FITORREMEIADOR SOB INFLUÊNCIA DOS HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOX.....</b>	<b>45</b>
INTRODUÇÃO.....	46
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	58
<b>FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDAS INIBIDORES DE PROTOX POR ESPÉCIES DE INVERNO.....</b>	<b>62</b>
INTRODUÇÃO.....	63
MATERIAL E MÉTODOS.....	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	79
<b>EFFECT OF HERBICIDES IN THE OXIDATIVE STRESS IN CROP WINTER SPECIES.....</b>	<b>82</b>
INTRODUCTION.....	85
MATERIAL AND METHODS.....	86
RESULTS.....	88
DISCUSSION.....	90
REFERENCES.....	92
FIGURES.....	94
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....</b>	<b>104</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o segundo maior produtor de soja e milho e no contexto regional, o Rio Grande do Sul é o terceiro maior produtor de grãos do país, sendo a região norte do Estado responsável por grande parte da produção. Os resultados em produtividade poderiam ser ainda mais satisfatórios se não fosse pela ocorrência de plantas daninhas e controle inadequado das mesmas. Para controlar as plantas daninhas são utilizados herbicidas, que no Brasil representam 69% dos agrotóxicos aplicados nas lavouras (SINDIVEG, 2016).

A permanência de alguns herbicidas no solo por longos períodos pode provocar o processo conhecido como *carryover*, podendo permanecer no solo por longos períodos. Pode ainda apresentar maiores riscos de contaminação do ambiente, seja por lixiviação, volatilização e erosão. O solo é o destino final dos produtos químicos usados na agricultura (Mancuso et al. 2011). O comportamento de herbicidas no solo é muito complexo, como observado por alguns autores (Inoue et al., 2008; Oliveira JR. et al., 2011), pois ao entrarem em contato com o solo, os herbicidas estão sujeitos a processos biológicos, físicos e químicos que regulam o destino dos mesmos no ambiente.

Várias alternativas para descontaminação de solos tratados com herbicidas foram testadas dentre elas a utilização de enzimas, microrganismos, bombeamento e o uso da técnica de fitorremediação tem ganhado destaque (Marques, 2005, Marques et al., 2011). As vantagens da utilização de plantas na bioremediação de herbicidas são inúmeras, melhorando a qualidade do solo, evitando a lixiviação para águas superficiais e subterrâneas. Além disso, outra vantagem da fitorremediação é o menor custo em comparação às técnicas tradicionais de descontaminação. As plantas utilizadas ainda podem auxiliar no controle de processos erosivos, eólicos e hídricos, apresentando estética agradável e de fácil aceitação (Arthur et al., 2012, Moosavi e Seghatoleslami, 2013).

Desta maneira, o emprego de plantas e comunidades microbianas associadas à rizosfera para degradar, isolar ou imobilizar poluentes no solo, são a base da técnica. Os solos contaminados com herbicidas apresentam certas limitações à seleção de espécies de plantas remediadoras, por serem, muitas vezes, tóxicos a estas, principalmente compostos de largo espectro de ação (Pires et al., 2003, Santos et al., 2007).

A tolerância da planta à presença do contaminante é resultante de diversos mecanismos complexos, nem todos completamente elucidados. Estudos mencionam micorrizas como uma das estratégias extracelulares para reduzir a toxidez de metais em plantas e, mais recentemente, para remoção de compostos orgânicos (Joner e Levval, 2009). Por princípio deve-se escolher espécies com bom potencial remediador e que não causem

problemas de controle futuramente. As espécies de interesse agrônomo, como forrageiras, utilizadas como coberturas de solo ou como adubos verdes, são mais indicadas em função do fácil controle, produzem grande quantidade de matéria fresca e seca, são fixadoras de nitrogênio (leguminosas) atraentes pelo baixo custo e eficiência na descontaminação. Auxiliam ainda na proteção do solo contra processos erosivos e cobertura vegetal no controle de plantas daninhas (Pires et al., 2003; Pires et al., 2005; Santos et al., 2007).

Vários processos estão envolvidos na transformação dos contaminantes pelas plantas, e os herbicidas assim como outros compostos orgânicos podem ser degradados lenta ou rapidamente. A absorção do herbicida pelas raízes se dá por meio da fitoextração, podendo ser armazenado ali mesmo, ou ser transportado até a parte aérea da planta, e acumulado, denominando-se fitoacumulação. Na fitoestabilização o contaminante permanece na planta ou é umidificado pelas raízes e microrganismos. A fitovolatilização pode ocorrer quando há absorção e posterior conversão em formas voláteis das substâncias químicas que são liberadas no ambiente. Adicionalmente dois processos que não podem ser tratados separadamente são a fitoestimulação e a rizodegradação, sendo assim a atividade de microrganismos nas raízes possibilita maior absorção e/ou degradação de herbicidas. Solos cultivados com leguminosas e contaminado com o tebuthiron, apresentou maior atividade microbiana, comparado com solo sem vegetação. O processo que envolve a degradação do agrotóxico em compostos não tóxicos, pela planta fitorremediadora, é chamada fitodegradação (Cunningham et al., 1996; Accioly e Siqueira, 2000; Scramin et al., 2001; Pires et al., 2003; 2005; Santos et al., 2007).

Tendo em vista que nem todas as espécies vegetais desenvolvem-se em ambientes contaminados, o primeiro passo é a identificação das espécies que, além de adaptadas às condições locais, sejam tolerantes ao contaminante. Essa varredura (*screening*) pode ser feita por meio da avaliação da taxa de germinação e da produção de biomassa na presença de concentrações crescentes do contaminante no solo (Marques et al., 2006, 2010). Alterações nas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, também podem ser utilizadas na identificação de espécies capazes de fitorremediar herbicidas.

Estudos relacionados com a fitorremediação esbarraram em algumas dificuldades, como por exemplo, a concentração que o contaminante se encontra no solo requerendo maior tempo para descontaminação, condições climáticas adversas que podem afetar o desenvolvimento de algumas espécies fitorremediadoras, tipo e pH do solo. Ainda, é preciso considerar que o contaminante precisa estar ao alcance do sistema radicular das plantas fitorremediadoras.

Alguns autores ao avaliar a capacidade de espécies com potencial fitorremediador descobriram que o braquiária, campim mombaca, capim tanzania, capim-elefante, capim-pé-

de-galinha gigante, milho, sorgo, capim-pojuca e milho foram capazes de descontaminar o solo tratado com picloram (Carmo et al., 2008), e mucuna preta e feijão de porco despoluíram o solo contaminado com trifloxyfuron-sodium (Santos et al., 2004) e ervilhaca retirou os herbicidas imazethapyr + imazapic e imazapyr + imazapic (Galon et al., 2014).

Herbicidas inibidores da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) como fomesafen apresentam meia vida de 60 a 180 dias (Rodrigues e Almeida, 2011). Silva et al. (2007) verificaram que o fomesafen interferiu na germinação de plantas daninhas monocotiledôneas, em solo do tipo Latossolo amarelo, com intervalo igual a 78 dias entre a aplicação e a coleta para avaliação. O herbicida sulfentrazone, por sua vez, também inibidor da enzima PROTOX, apresenta de 110 a 280 dias de meia vida no solo (Rodrigues e Almeida, 2011).

O milho foi definido como espécie sensível ao herbicida sulfentrazone aplicado em pré-emergência para o controle de plantas daninhas infestantes da soja (Dan et al., 2011). Crotalaria júncea, feijão de porco, feijão guandu e feijão guandu anão foram identificadas como espécies possíveis a serem utilizadas na fitorremediação de sulfentrazone (Madalão, 2011)

O mecanismo de ação de herbicidas inibidores da PROTOX está envolvido com a inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase, que atua na oxidação de protoporfirinogênio a protoporfirina IX (precursor da clorofila) e de grupamentos heme. Com a inibição da enzima PROTOX ocorre acúmulo de protoporfirinogênio no cloroplasto, então ele se difunde para o citoplasma, ocorrendo a oxidação formando potoporfirina IX. No citoplasma e na presença de luz a protoporfirina IX interage com o oxigênio formando um singleto. Esse O<sub>2</sub> no estado singleto é responsável pela peroxidação de lipídeos nas membranas celulares. Como efeito cascata os radicais livres são formados resultando na degradação de lipídeos e proteínas que leva a perda de clorofila, carotenoides e rompimento das membranas celulares (Duke et al., 1991; Hess, 2000; Vidal, 2002 e Marchi et al., 2008).

Cabe salientar que as plantas estão expostas a uma grande variedade de estresses que podem alterar seu metabolismo e desenvolvimento, alterando ciclos celulares e moleculares. As respostas a esses fatores estressantes podem ser desencadeadas por sinais primários ou secundários, dependendo do fator que o desencadeou. Esses fatores podem ser a seca, elevada salinidade, temperaturas extremas, radiação ultravioleta, deficiência de nutrientes, alta luminosidade, metais pesados, hipóxia e agrotóxicos (Flowers et al., 2000; Zhu, 2002; Chagas, 2007).

Uma das principais alterações metabólicas durante o estresse é o aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos oxidativos. O aumento da produção

de ROS em condições estressantes perturba a homeostase celular e atua como sinalizador para a ativação da resposta oxidativa (Apel e Hirt, 2004; Foyer e Nört, 2005; Chagas, 2007).

Para impedir ou minimizar os danos oxidativos, as plantas possuem um sistema antioxidativo enzimático e não enzimático nos diversos compartimentos celulares. Dentre as principais defesas antioxidantes enzimáticas tem-se a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e as catalases (CAT) que junto com enzimas do ciclo ascorbato glutatona, promovem a eliminação dos ROS. O nível de estresse em uma célula é determinado pela quantidade de ROS presentes nas formas de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas. Assim, sabendo o papel das enzimas SOD, APX e CAT o balanço de suas atividades é muito importante na diminuição dos níveis de ROS nas células (Apel e Hirt, 2004, Cavalcanti et al., 2004, Erinle et al., 2016).

Dentre os fatores de estresse, aos quais as plantas estão susceptíveis, pode-se salientar o papel dos agrotóxicos, mais especificamente os herbicidas. Dessa forma, considerando a fitorremediação uma estratégia que precisa ser estudada e compreendida em todos os processos envolvidos, promovendo a qualidade ambiental e aumento da produtividade agrícola. É necessário avaliar o potencial fitorremediador de espécies, com interesse econômico para a região de abrangência das instituições envolvidas, e que atentem às características fisiológicas e bioquímicas que as classifiquem como boas espécies fitorremediadoras. Assim, o presente estudo avalia a tolerância de espécies com potencial fitorremediador de inverno, a saber: aveia preta, ervilhaca, cornichão, nabo e tremoço, e verão: crotalária, milho, mucuna preta e sorgo, expostas aos herbicidas fomesafen e sulfentrazone, através da análise dos efeitos às características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das plantas.

## **RESULTADOS**

**Os resultados da presente dissertação serão apresentados em cinco artigos científicos:**

**Artigo 1: TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ANUAIS DE INVERNO A HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOPORFIRINOGENO OXIDASE (PROTOX)**

**Artigo 2: TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ANUAIS DE VERÃO A HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOPORFIRINOGENO OXIDASE (PROTOX)**

**Artigo 3: CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE PLANTAS HIBERNAIS COM POTENCIAL FITORREMEIADOR SOB INFLUÊNCIA DOS HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOX**

**Artigo 4: FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDAS INIBIDORES DE PROTOX POR ESPÉCIES DE INVERNO**

**Artigo 5: HERBICIDES INDUCED OXIDATIVE STRESS IN PLANTS WITH PHYTOREMEDIATION POTENTIAL (ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS COM POTENCIAL FITORREMEIADOR DE HERBICIDAS)**

**Artigo 1**

**TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ANUAIS DE INVERNO A HERBICIDAS INIBIDORES  
DA PROTOPORFIRINOGÊNIO OXIDASE (PROTOX)**

**O artigo apresenta-se escrito sob as normas da revista Planta Daninha, para posterior  
submissão a mesma.**

## TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ANUAIS DE INVERNO A HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOPORFIRINOGENO OXIDASE (PROTOX)

**RESUMO** - O emprego de espécies vegetais para fitorremediação de solos contaminados com herbicidas é uma alternativa que vem ganhando destaque para minimizar os efeitos da persistência de agrotóxicos no ambiente. Objetivou-se com o trabalho avaliar o potencial de tolerância de espécies de inverno em solo contaminado com sulfentrazone e fomesafen, herbicidas inibidores da PROTOX. O delineamento utilizado foi o completamente casualizado, com quatro repetições. Foram aplicadas doses dos herbicidas fomesafen (0,0; 0,125; 0,250 e 0,5 kg ha<sup>-1</sup>) e de sulfentrazone (0,0; 0,3; 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup>) em pré-emergência das espécies fitorremediadoras (aveia preta, cornichão, ervilhaca, nabo e tremoço). Aos 50 dias após a emergência das espécies foram avaliadas as variáveis, fitotoxicidade (%), área foliar (cm<sup>2</sup>), diâmetro de colmo e/ou caule (mm), altura (cm) e massa seca (g) das plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, em havendo significância aplicou-se regressões lineares ou não lineares para avaliar o efeito das doses dos herbicidas sobre as espécies estudadas. O cornichão foi a espécie menos tolerante aos herbicidas fomesafen e sulfentrazone. A aveia preta foi a espécie pouco afetada pela aplicação das doses de fomesafen, porém se demonstrou altamente suscetível ao sulfentrazone. O nabo apresentou tolerância apenas até a dose de 0,25 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen, para o sulfentrazone a espécie apresentou tolerância. A espécie mais tolerante ao fomesafen e ao sulfentrazone, indiferentemente da dose foi o tremoço, de modo que apresenta uma possível alternativa para a fitorremediação de solos contaminados com esses herbicidas.

**Palavras chave:** Sulfentrazone, Fomesafen, Fitorremediação, *Lupinus albus*

## TOLERANCE OF ANNUAL WINTER SPECIES TO HERBICIDES INHIBITORS OF PROTOPORFIRINOGEN OXIDASE (PROTOX)

**ABSTRACT** - The use of plant species for phytoremediation of soils contaminated with herbicides is an alternative that has been emphasizing to minimize the effects of the persistence of agrochemicals in the environment. The objective of this work was to evaluate the tolerance potential of winter species in soil contaminated with sulfentrazone and fomesafen, PROTOX inhibitor herbicides. The design was completely randomized, arranged in a 5 x 4 factorial scheme with four replications. Factor A was composed of the phytoremediate species (*Avena sativa*, *Vicia sativa*, *Raphanus sativus*, *Lotus corniculatus* and *Lupinus albus*) and B was composed by the doses of fomesafen (0.0, 0.125, 0.250, 0.5 kg ha<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>), and sulfentrazone (0.0, 0.3, 0.6 and 1.2 kg ha<sup>-1</sup>), applied in pre-emergence of the winter coverings. At 50 days after the emergence of the species, the variables phytotoxicity (%), leaf area (cm<sup>2</sup>), stem diameter and / or stem (mm), height (cm) and dry mass (g) of the plants were evaluated. The data were submitted to analysis of variance by the F test, where linear or non linear regressions were applied to evaluate the effect of herbicide doses on the species studied. The cornichão was the species less tolerant to the herbicides fomesafen and sulfentrazone. The *A. sativa* was the specie less affected by the application of fomesafen doses, but was shown to be highly susceptible to sulfentrazone. The *L. albus* presented tolerance only up to the dose of 0.25 kg ha<sup>-1</sup> of fomesafen, for the sulfentrazone the species showed tolerance. The most tolerant species to the herbicides fomesafen and sulfentrazone, independent of the dose was *L. albus*, so that it presents a possible alternative for the phytoremediation of soils contaminated with these herbicides.

**Keywords:** Sulfentrazone, Fomesafen, Phytoremediation, *Lupinus albus*

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil, tornou-se o maior consumidor mundial de agrotóxicos, e os herbicidas representam cerca de 69% desse total (SINDIVEG, 2016). Em decorrência do grande uso de herbicidas tem-se preocupações com a contaminação de águas superficiais e subterrâneas (Celis et al., 2005). Alguns herbicidas podem contaminar o solo, impedindo cultivos em sucessão a sua aplicação ou mesmo atingir as águas por lixiviação, o que leva a problemas ambientais graves e que de acordo com a composição do solo, as características físico-químicas do contaminante, das condições climáticas (Santos et al., 2007; D'Antonino et al., 2009; Santos et al., 2013) e dos manejos e tratos culturais adotados com as culturas pode inviabilizar o uso de uma determinada área.

O uso de herbicidas para a produção de grãos torna-se indispensável, principalmente quando as lavouras estão infestadas com *Portulaca oleracea* (beldroega), *Amaranthus* spp. (caruru), *Ipomoea* spp. (corda-de-viola), *Bidens* sp. (picão-preto), *Richardia brasiliensis* (poaia-branca), *Commelinas benghalensis* e *diffusa* (trapoerabas), *Euphorbia heterophylla* (leiteiro) *Sida rhombifolia* (guanxuma), *Spermacoce latifolia* (erva-de-touro), *Borreria alata* (erva-quente) pertencentes a família Ateraceae, e *Urochloa brizantha* (brizantão), *U. decumbens* (capim-braquiária), *U. plantaginea* (papuã), *Cenchrus echinatus* (capim carrapicho), *Chloris* sp (capim branco), *Digitaria* spp. (capim colchão), *D. insularis* (capim-amargoso), *Echinochloa colonum* (capim-arroz), *Eleusine indica* (capim-pé-de-galinha), *Panicum maximum* (capim-colonião), *Pennisetum setosum* (capim-custódio), *Rhynchelytrum*

*repens* (capim-favorito), *Setaria geniculata* (capim-rabo-de-raposa), pertencentes a família Poaceae, dentre outras.

Muitas destas espécies de plantas daninhas causam consideráveis perdas a produtividade e a qualidade do produto colhido. Entre os métodos de controle, o químico torna-se prática indispensável para a agricultura em larga escala, por sua menor dependência de mão de obra, eficiência e rapidez no manejo das plantas daninhas quando comparado a outros métodos de controle (Santos et al., 2013).

Dentre os herbicidas inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), utilizados para o controle de plantas daninhas infestantes das culturas de soja, feijão, cana-de-açúcar, e citros, o fomesafen e o sulfentrazone demonstram problemas de *carryover*. Apesar dos herbicidas pertencentes a esse mecanismo de ação apresentarem elevada eficácia para o controle das plantas daninhas, esses apresentam características físico-químicas que os permitem persistir no ambiente por tempo prolongado. Esses herbicidas também aumentam a chance de ocorrer lixiviação das moléculas ou metabólitos para as camadas mais profundas no perfil do solo, podendo atingir o lençol freático (Procópio et al., 2004).

Para amenizar os problemas ocasionados pela alta persistência dos herbicidas no solo, tem-se utilizado a fitorremediação como estratégia de descontaminação (Santos et al., 2007). Essa técnica consiste na descontaminação do solo ou água utilizando plantas e sua microbiota associada. Entretanto os solos contaminados com herbicidas apresentam limitações para a seleção de espécies de plantas remediadoras, por serem, muitas vezes, tóxicos a estas, principalmente onde estão presentes herbicidas de amplo espectro de ação. Esta alternativa consiste em manejar ao longo do tempo a degradação dos contaminantes que ocorre por meio de processos naturais - tem-se mostrado viável nos casos em que ocorrem condições biogeoquimicamente favoráveis e pode ser efetiva na remediação de solos e águas subterrâneas quando utilizada paralelamente a outras tecnologias, ou isoladamente, se comprovada ao longo de um período de monitoramento.

Poucos são os estudos na área da fitorremediação de solos contaminados por herbicidas, em especial no Estado do Rio Grande do Sul. Alguns estudos já demonstraram que as espécies *Stizolobium aterrimum*, *Canavalia ensiformis* e *Eleusine coracana* são, comprovadamente, eficientes na descontaminação de áreas tratadas com trifloxysulfuron-sodium, tebuthiuron e picloram (Santos et al., 2007; D'Antonino et al., 2009), *Vicia sativa* e *Lolium multiflorum* para despoluir solos contaminados com imazethapyr+imazapic e imazapyr+imazapic (Galon et al., 2014), misturas comerciais utilizadas para o manejo de plantas daninhas infestantes do arroz irrigado. Sabe-se que o provável mecanismo envolvido na descontaminação dos solos por essas espécies seja a interação da fitoestimulação e da fitodegradação. Assim sendo, tornam-

se necessários estudos que visem a seleção de espécies capazes de degradar ou imobilizar os herbicidas no solo e/ou na planta.

A hipótese desse trabalho é de que as espécies; aveia preta, ervilhaca, cornichão, nabo e tremoço apresentam potencial de descontaminar solo poluído com os herbicidas sulfentrazone e fomesafen. Com isso objetivou-se com o trabalho avaliar o potencial de tolerância de espécies de inverno cultivadas em solo contaminado com sulfentrazone e fomesafen, herbicidas inibidores de PROTOX.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos em casa de vegetação na XXXX. Utilizou-se diferentes espécies de plantas para identificar qual apresenta potencial de tolerar a aplicação de fomesafen e sulfentrazone para posterior emprego como fitorremediadoras de áreas contaminadas pelos herbicidas a campo. As espécies utilizadas foram: aveia preta (*Avena sativa*), ervilhaca (*Vicia sativa*), nabo (*Raphanus sativus*), cornichão (*Lotus corniculatus*) e tremoço-branco (*Lupinus albus*). Essas espécies foram selecionadas por apresentarem importância agrícola para o Estado do Rio Grande do Sul, onde são utilizadas como pastagens, cobertura do solo ou para a produção de grãos.

Foram instalados dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo o primeiro instalado com o herbicida fomesafen e o segundo com o sulfentrazone, marcas comerciais Flex<sup>®</sup> e Boral 500<sup>®</sup>, respectivamente. Ressalta-se que ambos os herbicidas são muito utilizados para o controle de plantas daninhas infestantes das culturas do fumo, soja, feijão, cana-de-açúcar e citros. Foram aplicadas doses de fomesafen (0,0; 0,125; 0,250 e 0,5 kg ha<sup>-1</sup>) e de sulfentrazone (0,0; 0,3; 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup>) sobre as espécies fitorremediadoras (aveia preta, cornichão, ervilhaca, nabo e tremoço), em pré-emergência dessas coberturas de inverno.

As unidades experimentais foram constituídas por vasos de polietileno com capacidade para 8 dm<sup>3</sup>, preenchidos com Latossolo Vermelho Alumino-férrico húmico (Embrapa, 2013) proveniente de área livre da aplicação de herbicidas. A correção da fertilidade do solo foi efetuada com base na análise química do mesmo e de acordo com as recomendações técnicas para as culturas envolvidas nos ensaios (ROLAS, 2004). As características químicas e físicas do solo foram: pH em água de 4,8; MO = 3,5%; P= 4,0 mg dm<sup>-3</sup>; K= 117,0 mg dm<sup>-3</sup>; Al<sup>3+</sup>=0,6 cmolc dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup>= 4,7 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup>= 1,8 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC(t)= 7,4 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC(TpH=7,0)= 16,5 cmolc dm<sup>-3</sup>; H+Al= 9,7 cmolc dm<sup>-3</sup>; SB= 6,8 cmolc dm<sup>-3</sup>; V= 41%; e Argila= 60%.

Foram semeadas 15 sementes por vaso que após a emergência foi feito o desbaste das mesmas deixando-se 10 plantas por vaso. Um dia após a semeadura das espécies aplicou-se os herbicidas fomesafen e sulfentrazone, utilizando-se pulverizador costal de precisão, equipado com duas pontas de pulverização da série TT 110.02, o qual pulverizou um volume de calda de 150 L ha<sup>-1</sup>. A irrigação foi controlada diariamente nas unidades experimentais, mantendo-se a umidade em torno de 80% da capacidade de campo.

Aos 45 dias após a emergência das plantas (DAE) avaliou-se: a fitotoxicidade (%), a altura de plantas (cm), o diâmetro de colmos e/ou de caule (mm), a área foliar (cm<sup>2</sup>/vaso) e a massa seca da parte aérea (g/vaso). Para avaliar a fitotoxicidade dos herbicidas foram atribuídas notas percentuais, sendo zero (0%) aos tratamentos com ausência de injúrias e cem (100%) para a morte total das plantas de acordo a metodologia proposta pela SBCPD (1995). A estatura de planta foi aferida com régua graduada em centímetros, medindo-se desde rente ao solo até o ápice da última folha completamente expandida. O diâmetro de colmos e/ou de caules foi determinado com auxílio de paquímetro digital a cinco cm do solo. A área foliar foi aferida com medidor portátil de área foliar modelo CI-203 BioScience em cinco plantas de cada tratamento. Após a determinação da área foliar as plantas foram acondicionadas em sacos de papel, postas para secagem em estufa com circulação forçada de ar, a temperatura de 60±5°C, até o material atingir massa constante para aferir-se a massa seca da parte aérea das espécies.

Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, em havendo significância aplicou-se regressões lineares ou não lineares para avaliar o efeito das doses dos herbicidas sobre as espécies estudadas. Ressalta-se que não foram efetuadas as comparações, para as variáveis testadas, entre as espécies por elas naturalmente apresentarem diferenças. Todos os testes foram efetuados a 5% de probabilidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Avaliando os resultados apresentados nas Figura 1, 2, 3, 4 e 5 observou-se efeito significativo das doses de sulfentrazone e fomesafen sobre as variáveis testadas para a aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço.

Os resultados encontrados para a fitotoxicidade do herbicida fomesafen ao ser aplicado sobre o nabo, demonstraram um aumento de 26%, na maior dose aplicada, em relação a metade da dose, sendo que ocasionou a morte total das plantas. As plantas de ervilhaca apresentaram diferenças significativas para a fitotoxicidade, aumentando os sintomas de acordo com o incremento da dose, porém as injúrias não foram tão pronunciadas, com no

máximo 20%. Não houve significância ao se aplicar fomesafen sobre as espécies de aveia preta e tremoço, com médias de 4 e 10%, respectivamente (Figura 1A).

A ervilhaca, o nabo e o tremoço foram as espécies que apresentaram os menores sintomas de fitotoxicidade, com aumento linear, conforme o incremento das doses do herbicida sulfentrazone (Figura 1B). Em trabalho desenvolvido por (Galon et al., 2014) os autores relatam que a ervilhaca apresentou a menor fitotoxicidade quando submetida a aplicação de imazapic + imazapyr, o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo em relação ao sulfentrazone.

O cornichão e a aveia preta apresentaram valores elevados de fitotoxicidade ocorrendo à morte do cornichão e injúrias próximas a 80% para a aveia preta na dose mais elevada de sulfentrazone ( $1,2 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Em trabalho de Galon et al. (2014), os autores observaram severos sintomas de fitotoxicidade dos herbicidas imazethapyr + imazapic e imazapyr + imazapic sobre a aveia silvestre e sobre o nabo, ao usarem essas espécies como potencialmente fitorremediadoras de solo. Krenchinski et al. (2013) ao avaliar a fitotoxicidade de duas diferentes formulações de glyphosate (Zapp QI® - ZQ e Glyphosate 480 Agripec® - GA) observaram que quatro dias após a aplicação de ZQ a espécie que apresentou maior fitotoxicidade diferindo significativamente das demais foi a aveia branca. Dezesesseis dias após a aplicação para o herbicida GA a espécie nabo-forrageiro apresentou maior fitotoxicidade diferindo significativamente de azevém.

O aumento nos sinais de fitointoxicação ocorre em plantas submetidas a herbicidas inibidores da enzima Protox, enzima responsável pela síntese da clorofila e do grupo heme, inibindo a transformação do protoporfirrogênio para protoporfirina. O protoporfirrogênio acaba acumulando no citoplasma das células como protoporfirina. Nas células fotossintéticas e com a presença de  $\text{O}_2$ , protoporfirina favorece a formação de oxigênio *singlet* que age como radical livre, provocando a peroxidação lipídica das membranas celulares, ocasionando clorose e a morte celular (Lee et al., 1993; Dayan & Weete, 1996; Hulting et al., 2001).

Os resultados demonstram que o nabo apresentou diminuição significativa na altura de plantas com o incremento das doses de fomesafen, tendo ocorrido a morte da maioria das plantas (Figura 2A). A aveia preta, a ervilhaca, o cornichão e o tremoço não apresentaram diferenças significativas no crescimento em relação a testemunha sem aplicação ( $0 \text{ g ha}^{-1}$ ), com médias de 36,11; 16,61; 6,09 e 27,41 cm, respectivamente.

O incremento da dose de sulfentrazone ocasionou menor altura das plantas de cornichão, ocorrendo a morte da cultura ao se aplicar  $1,2 \text{ kg ha}^{-1}$  do herbicida, ou seja, na maior dose aplicada. Para as espécies de aveia preta, ervilhaca, nabo e tremoço, não ocorreu diferença significativa na altura de plantas, com o incremento das doses de sulfentrazone

(Figura 2B). Madalão et al. (2013) ao avaliarem plantas de *Calopogonium mucunoides*, híbrido de sorgo (*Sorghum bicolor* x *S. sudanense*), *Crotalaria breviflora*, *C. juncea*, *Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab*, *Stizolobium deeringianum* e *S. aterrimum* aos 60 dias após a emergência, observaram redução da altura das plantas, com o incremento das doses de sulfentrazone. Nesse mesmo estudo a *C. ensiformis* apresentou a menor redução de altura, enquanto que *S. deeringianum* e *S. aterrimum* as maiores reduções.

Os resultados relativos ao diâmetro de colmos e/ou de caules demonstraram que ocorreu diminuição significativa ao se aplicar o fomesafen à cultura do nabo com uma redução de 38% na dose de 0,25 kg ha<sup>-1</sup> ao se comparar com a dose zero (Figura 3A). A Aveia preta, ervilhaca, cornichão e o tremoço não apresentaram diferenças significativas, quando submetidas as doses crescentes de fomesafen. Enquanto que para o sulfentrazone o cornichão apresentou menor diâmetro com o incremento das doses aplicadas. As espécies, aveia preta, tremoço, ervilhaca e o nabo não apresentaram diferenças significativas com a aplicação das doses de sulfentrazone (Figura 3b). Simplício et al. (2016) ao avaliarem os efeitos de doses de quizalofope-p-metílico e linuron, não observaram diferenças no tamanho do caule de feijão-caupi, não sendo afetado pelas doses dos herbicidas aplicados.

Observou-se que não houve diferenças significativas entre a dose 0 e a aplicação da maior dose de fomesafen para a área foliar da aveia preta e do tremoço. A ervilhaca apresentou um aumento de 7% ao se aplicar 0,5 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen em relação a testemunha (0 kg ha<sup>-1</sup>) (Figura 4A). O cornichão não apresentou valores de área foliar, ou seja, ocorreu a morte de todas as plantas com o uso do fomesafen. O nabo apresentou diminuição significativa de área foliar com o incremento das doses de fomesafen, sendo que na dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup>, ocorreu a morte das plantas. Já para o sulfentrazone a ervilhaca apresentou um decréscimo de sua área foliar de 28%, com o aumento das doses do herbicida (Figura 4B). O inverso foi observado por Belarmino et al. (2012), ao trabalharem com *Lolium multiflorum*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, *Festuca arudinacea*, *Vicia sativa* e *Brassica napus* expostas a doses de imazapic + imazapyr observaram maior desenvolvimento de área foliar nas espécies que apresentaram menor fitotoxicidade. Em trabalho de Linhares et al. (2014), ao avaliarem o efeito de fomesafen sobre a área foliar de feijão-caupi, observaram fitotoxicidade severa causada pelo herbicida, resultando em redução da área foliar, aos 10 dias após a emergência. Porém com a emissão de novas folhas ocorreu a retomada do acúmulo de área foliar por volta dos 19 dias após a emergência, com comportamento semelhante ao tratamento sem aplicação de herbicidas, com atraso de aproximadamente sete dias.

Estes resultados demonstram que a área foliar está correlacionada com a fitotoxicidade das plantas, pois na medida em que houve aumento das injúrias do herbicida ocorreu

diminuição da área foliar. Ao testar níveis de compactação e a presença de sulfentrazone no solo sobre plantas de milho, Zobiolo et al. (2007), observaram que a área foliar foi afetada pela interação entre os níveis de compactação do solo na presença ou ausência do herbicida.

A aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço não apresentaram diferenças significativas quanto a massa seca quando submetidas as doses de fomesafen. Para a massa seca da parte aérea das plantas de todas as coberturas de inverno testadas não houve ajuste dos dados aos modelos estatísticos, exceto a aveia preta ao se aplicar o herbicida sulfentrazone (Figuras 5 A e B). Ocorreu redução significativa no acúmulo da massa seca da parte aérea da aveia preta, quando submetida a aplicação do sulfentrazone com redução de 27 e 55%, respectivamente com as doses de 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup> em relação as plantas sem aplicação do herbicida (Figura 5B). Ferrazo et al. (2017) observaram que à medida que se aumentou a dose de sulfentrazone ocorreu redução da massa seca em plantas de milho, do mesmo modo que aconteceu no presente trabalho com a aveia preta, possivelmente pelo fato de pertencerem a mesma família (Poaceae) e assim demonstrarem baixa seletividade ao herbicida. Madalão et al. (2012), também relatam a ocorrência de redução do acúmulo da massa seca em função do aumento da fitotoxicidade sobre *Pennisetum glaucum* em solo contaminado com sulfentrazone. A diminuição da altura, área foliar e diâmetro de caule das espécies, está intimamente relacionada com a fitotoxicidade ocasionada pelos herbicidas, demonstrando a capacidade de tolerância de cada espécie ao fomesafen e ao sulfentrazone.

As espécies avaliadas apresentam diferenças quanto a tolerância a aplicação de fomesafen e de sulfentrazone e também quanto a dose aplicada desses herbicidas em pré-emergência. O cornichão foi menos tolerante aos herbicidas e desse modo não apresenta potencial para fitorremediar solos tratados com sulfentrazone e fomesafen. A ervilhaca e a aveia preta ficaram em patamares intermediários de tolerância aos herbicidas. O nabo apresentou tolerância apenas até a dose de 0,25 g ha<sup>-1</sup> de fomesafen, para o sulfentrazone a espécie apresentou tolerância em todas as doses testadas. A espécie mais tolerante aos herbicidas foi o tremoço podendo ser indicada para os programas de fitorremediação em áreas que receberam aplicação de fomesafen e sulfentrazone.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao CNPq, a FAPERGS e o FINEp pela concessão de auxílio financeiro a pesquisa e pelas bolsas concedidas.

## LITERATURA CITADA

- Belarmino, J.G. et al. Seleção de espécies vegetais para fitorremediar solo contaminado com imazapic + imazapyr. In: Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 28. SBCPD. 2012;158-62.
- Celis, R. et al. Sorption and leaching behaviour of polar aromatic acids in agricultural soils by batch and column leaching tests. **Eur. J. Soil Sci.** 2005;56:287-297.
- Dayan, F.E.; Weete, J.D. Mechanism of tolerance to a novel phenyl triazolinone herbicide. **Plant Physiol.** 1996:111-119.
- D'Antonino, L. et al., Efeitos de culturas na persistência de herbicidas auxínicos no solo. **Planta Daninha**, 2009;27:371-78.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3 ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013. 353p.
- Ferraço, M. et al. Efeito da densidade populacional de *Canavalia ensiformis* na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Rev. Ciênc. Agron.** 2017;48:32-40.
- Galon, L. et al. Potential of plant species for bioremediation of soils applied with imidazolinone herbicides. **Planta Daninha**. 2014;32:719-26.
- Hulting, A.G. et al. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars tolerance to sulfentrazone. **Crop Prot.** 2001;20:679-683.
- Lee, H.J.; Duke, S.O.; Duke, M.V. Cellular localization of protoporphyrinogen-oxidizing activities of etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **Plant Physiol.** 1993;102:881-889.
- Linhares, C.M.S. et al. Crescimento do feijão-caupi sob efeito dos herbicidas fomesafen e bentazon+imazamox. **Rev. Caatinga**. 2014;27:41-49.
- Krenchinski, F.H. et al. Dessecação de espécies de cobertura do solo com formulações de glyphosate. **Rev. Bras. Herb.** 2013;12:104-111.
- Madalão et al. Susceptibilidade de espécies de plantas com potencial de fitorremediação do herbicida sulfentrazone. **Rev. Ceres**. 2013;60:111-121.
- Madalão, J. C. et al., Uso de leguminosas na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Pesq. Agropec. Trop.** 2012;12:390-96.
- Procópio, S.O. et al. Seleção de plantas com potencial para fitorremediação de solos contaminados com o herbicida trifloxysulfuron sodium. **Planta Daninha**, 2004;22:315-322.

REDE OFICIAL DE LABORATÓRIOS DE ANÁLISE DE SOLO E DE TECIDO VEGETAL (ROLAS). **Manual de adubação e calagem estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004.

Santos, D.P. et al. Determinação de espécies bioindicadoras de resíduos de herbicidas auxínicos. **Rev. Ceres**, 2013;60:354-62.

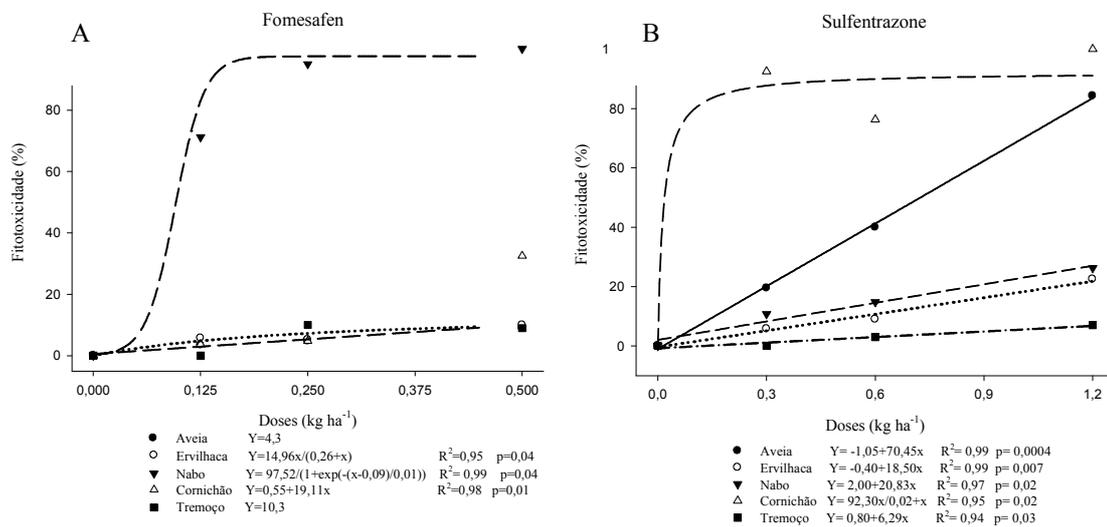
Santos, E.A. et al. Fitoestimulação por *Stizolobium aterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, 2007;25:259-65.

SBCPD - SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas. Londrina: 1995. 42 p.

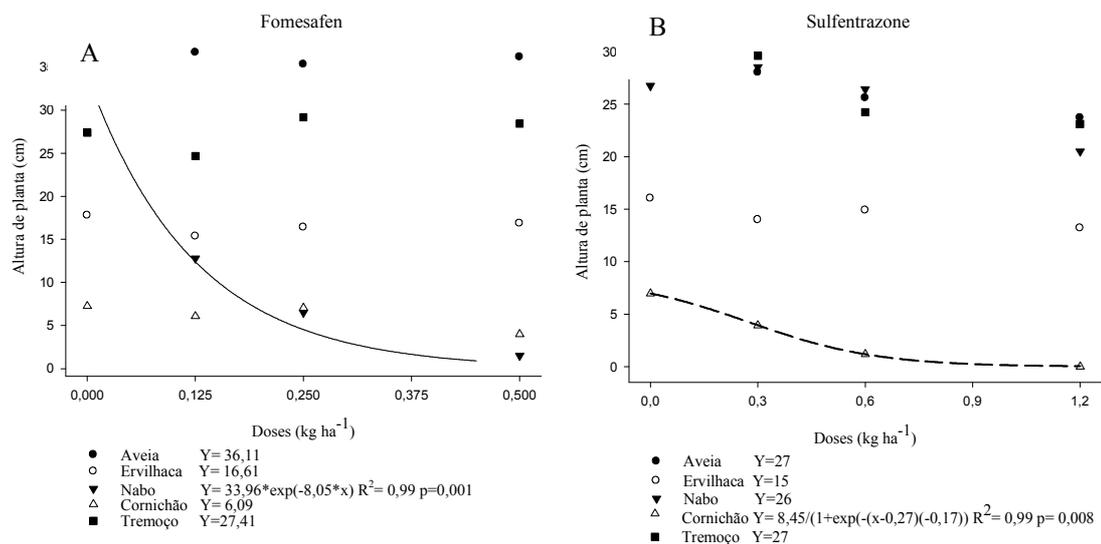
Simplicio, S.F. et al. Características de crescimento e produção do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) sob aplicação de herbicidas. **Revista AGROTEC**. 2016;37:55-62.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL – SINDIVEG. **Importações de defensivos agrícolas têm aumento no primeiro semestre de 2016**. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/importacoes-de-defensivos-agricolas-tem-aumento>>. Acesso em: 01/09/2016.

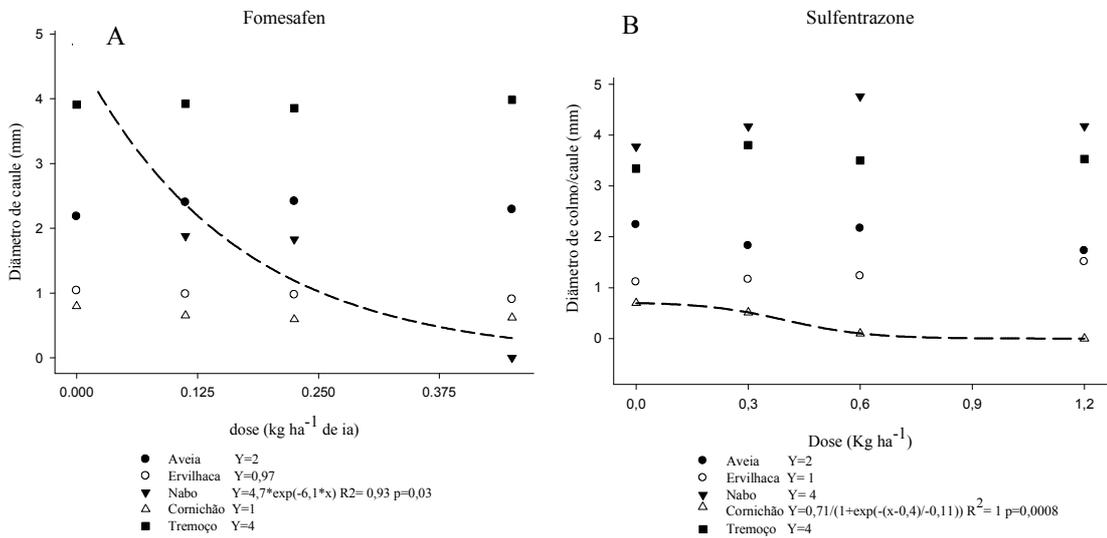
Zobiole, L.H.S. et al. Efeito da compactação do solo e do sulfentrazone sobre a cultura da soja em duas condições de água no solo. **Planta Daninha**. 2007;25;3:537-545.



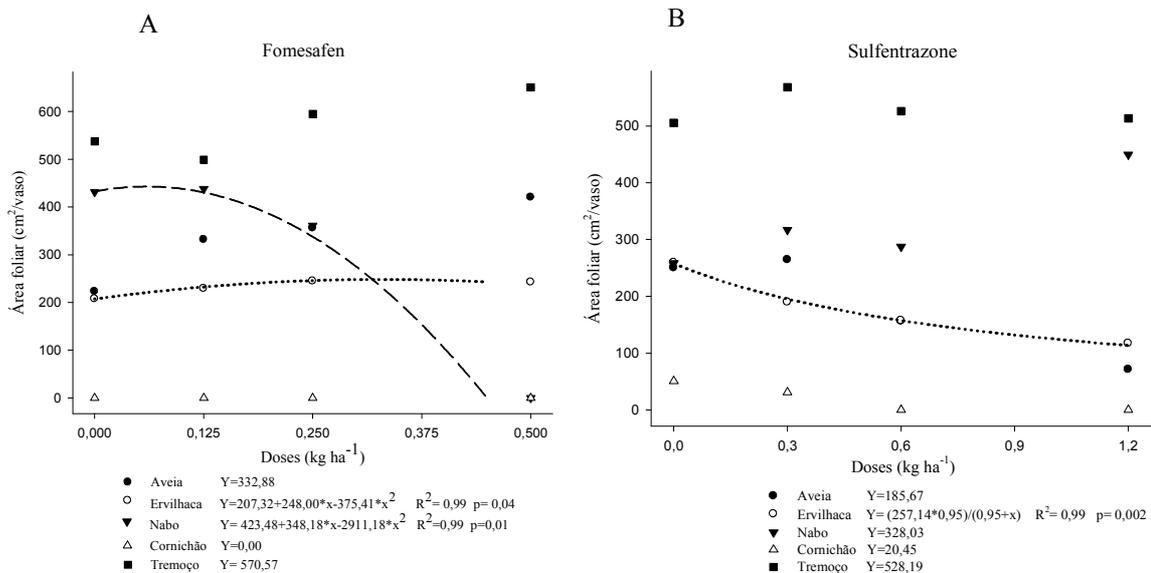
**Figura 1:** Fitotoxicidade (%) de herbicidas às espécies de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço, aos 45 dias após a emergência em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e de sulfentrazone (B).



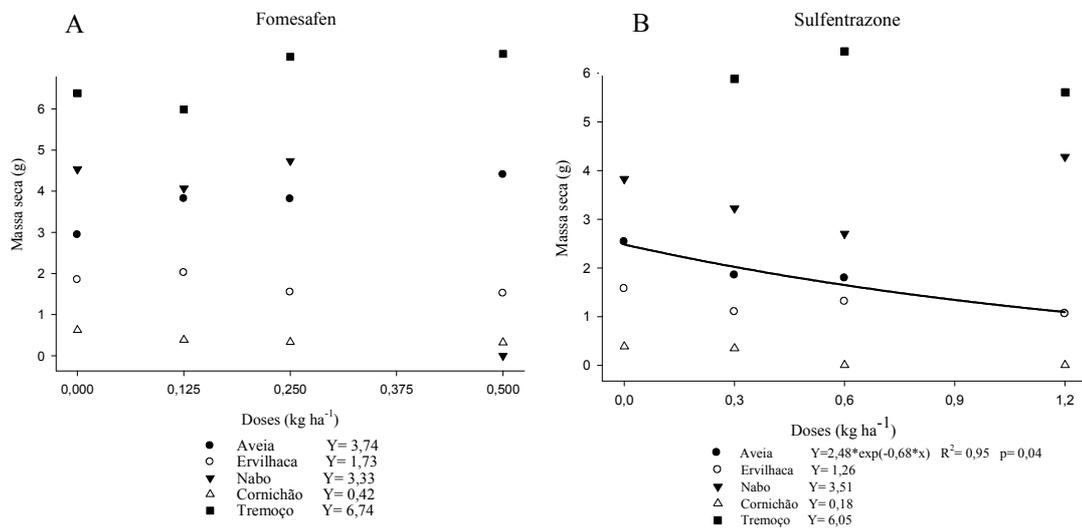
**Figura 2:** Altura de plantas (cm) das espécies aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B).



**Figura 3:** Diâmetro de colmos e/ou de caules (mm) das espécies aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço, aos 45 dias após a emergência em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B).



**Figura 4:** Área foliar (cm<sup>2</sup> vaso<sup>-1</sup>) das espécies, aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço, aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B).



**Figura 5:** Massa seca da parte aérea (g/vaso) das espécies, aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço, aos 45 dias após a emergência em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B).

**Artigo 2**

**TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ANUAIS DE VERÃO A HERBICIDAS INIBIDORES  
DA PROTOPORFIRINOGÊNIO OXIDASE (PROTOX)**

**O artigo apresenta-se escrito sob as normas da revista *Planta Daninha*, para posterior  
submissão a mesma.**

## TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ANUAIS DE VERÃO A HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOPORFIRINOGENIO OXIDASE (PROTOX)

**RESUMO** - O emprego da fitorremediação em solos contaminados com herbicidas é uma técnica que vem ganhando destaque para remoção desses do ambiente. Diante disso objetivou-se com o trabalho avaliar o potencial de tolerância de espécies cultivadas no verão para fitorremediação de solo contaminado com os herbicidas fomesafen e sulfentrazone. Os ensaios foram instalados em casa de vegetação da Universidade Federal da Fronteira Sul, em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições. Foram aplicadas doses dos herbicidas fomesafen (0,0; 0,125; 0,250 e 0,5 kg ha<sup>-1</sup>) e/ou de sulfentrazone (0,0; 0,3; 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup>) em pré-emergência das espécies fitorremediadoras (crotalária - *Crotalaria juncea*, milho - *Pennisetum glaucum*, mucuna preta - *Mucuna puriens* e sorgo - *Sorghum bicolor*). Aos 30 dias após a emergência das espécies foram avaliadas as variáveis, fitotoxicidade (%), área foliar (cm<sup>2</sup>), diâmetro de colmo e/ou caule (mm), altura (cm) e massa seca (g) das plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, em havendo significância aplicou-se regressões lineares ou não lineares para avaliar o efeito das doses dos herbicidas sobre as espécies estudadas. Ao se aplicar o dobro da dose comercial de fomesafen (0,5 kg ha<sup>-1</sup>), a mucuna preta e a crotalária apresentaram as menores alterações das variáveis testadas. As espécies mucuna preta, milho e sorgo toleraram o herbicida fomesafen até a dose recomendada (0,25 kg ha<sup>-1</sup>). O sulfentrazone apresentou maior efeito tóxico sobre as espécies, ocasionando a morte das plantas mesmo com a aplicação da metade das doses.

**Palavras-chave:** Fomesafen, Sulfentrazone, fitorremediação

## TOLERANCE OF ANNUALS SUMMER SPECIES TO HERBICIDES INHIBITORS OF PROTOPORFIRINOGENIO OXIDASE (PROTOX)

**ABSTRACT** - The use of phytoremediation on soil contaminated with herbicides is a technique that has been winning prominence in removing pesticides from the environment. The objective of this study was to evaluate the potential tolerance of species cultivated in the summer for phytoremediation of soil after the application of herbicides fomesafen and sulfentrazone. The tests were installed in a greenhouse at the Universidade Federal da Fronteira Sul, in a randomized block design, arranged in a 4 x 4 factorial scheme, with four replications. Factor A was composed by the summer species (*Crotalaria juncea*, *Pennisetum*

*glaucum*, *Mucuna puriens* e *Sorghum bicolor*). and B was composed of the doses of fomesafen (0,0, 0,125, 0,250 and 0,5 kg ha<sup>-1</sup>), and sulfentrazone (0, 0.3, 0.6 and 1.2 kg ha<sup>-1</sup>), applied in pre-emergence of summer coverings. At 30 days after the emergence of the species, the variables phytotoxicity (%), leaf area (cm<sup>2</sup>), stem diameter(mm), height (cm) and dry mass (g) of the plants were evaluated. The data were submitted to analysis of variance by the F test, where linear or non linear regressions were applied to evaluate the effect of herbicide doses on the species studied. When submitted to fomesafen, *C. juncea* and *M. puriens* showed the lowest changes of the tested variables when submitted to twice the dose of the herbicide (0.5 kg ha<sup>-1</sup>). The *M. puriens*, *P. glaucum* and *S. bicolor* tolerated the herbicide fomesafen up to the recommended dose (0.25 kg ha<sup>-1</sup>). Sulfentrazone presented a higher toxic effect on the species, causing death of the plants even with the application of half of the doses.

**Keywords** Fomesafen, Sulfentrazone, phytoremediation.

## INTRODUÇÃO

Na atualidade o controle das plantas daninhas infestantes das culturas agrícolas torna-se obrigatório para se alcançar altas produtividades e também para obter qualidade dos produtos colhidos. No entanto, para o controle das mesmas tem-se usado herbicidas como principal método de manejo, pela eficiência, praticidade e menor custo quando comparado a outras formas de controle. Porém muitos desses produtos podem ocasionar contaminação do solo, pela elevada persistência ou mesmo pelas características físico-químicas das moléculas.

Neste contexto, os herbicidas inibidores de PROTOX são muito utilizados para o controle de plantas daninhas infestantes das culturas da soja, feijão florestas, cana-de-açúcar, dentre outras (Rodrigues e Almeida, 2011). Uma das principais características destes herbicidas, é que podem permanecer no solo até a próxima estação de cultivo em concentrações capazes de causar danos as culturas semeadas em sucessão (Santos et al., 2012). Essa persistência no solo pode ser de alguns meses ou até mesmo de anos (Pires et al., 2003), dependendo do herbicida aplicado na lavoura.

Quando a molécula de um herbicida chega ao solo, ela pode ser degradada por processos químicos e/ou biológicos, ser sorvida aos colóides ou mesmo lixiviada (Belo et al., 2007). A sorção e a degradação do herbicida irão definir a disponibilidade do produto na solução do solo para ser absorvido pelas plantas ou lixiviado para camadas subsuperficiais do solo, podendo atingir os cursos de água subterrâneos (Prata e Lavorenti, 2000).

A fitorremediação tem se mostrado como uma técnica promissora para descontaminação de solos poluídos com vários herbicidas, como tebuthiuron (Pires et al., 2005), trifloxysulfuron-sodium (Santos et al., 2007), picloram (Carmo et al., 2008),

imazethapyr + imazapic e imazapyr + imazapic (Galon et al., 2014), dentre outros. Para adoção da fitorremediação tem-se a necessidade de identificar espécies que apresentem capacidade de descontaminar o solo, e que essas apresentem seletividade ou tolerância natural quando em contato com determinados herbicidas aplicados ao solo. Essa tolerância pode ser resultante de processos como a translocação diferencial de compostos orgânicos para outros tecidos, havendo subsequente volatilização e/ou degradação parcial ou completa transformação em compostos menos tóxicos (Pires et al., 2003). Outra possibilidade é a fitoestimulação, na qual, em razão da liberação de exsudatos radiculares, há o estímulo à atividade microbiana, que atua degradando o composto contaminante no solo (Santos et al., 2007).

Estudos efetuados preconizam que algumas características devem ser consideradas na escolha da espécie vegetal a ser utilizada em programas de remediação de áreas (quando for a campo) contaminadas por herbicidas, dentre elas: a) capacidade de absorção, concentração e/ou metabolização e tolerância ao herbicida; b) retenção do herbicida nas raízes, no caso da fitoestabilização, como oposto à transferência para a parte aérea, evitando sua manipulação e disposição; c) sistema radicular profundo e denso; d) alta taxa de crescimento e produção de biomassa; e) capacidade transpiratória elevada, especialmente em árvores e plantas perenes; f) fácil colheita, quando necessária a remoção da planta da área contaminada; g) elevada taxa de exsudação radicular; h) resistência a pragas e doenças; i) fácil aquisição ou multiplicação de propágulos; j) fácil controle ou erradicação; e k) capacidade de desenvolver-se bem em ambientes diversos (Newman et al., 1998; Accioly e Siqueira, 2000; Vose et al., 2000, Pires et al., 2003; Santos et al., 2007). O ideal seria reunir todas essas características numa só planta, porém, aquela que for selecionada deve reunir o maior número delas (Santos et al., 2007).

Outro aspecto a ser observado é que, embora a maioria dos testes avalie plantas isoladas, várias espécies podem, como sugerido por Miller (1996), serem usadas em um mesmo local, ao mesmo tempo ou subsequentemente, para promoverem maior descontaminação. Em essência, a espécie vegetal ideal para remediar um solo contaminado por herbicidas seria uma com alta produção de biomassa, que tanto pode tolerar como acumular o produto. Dessa forma, a escolha de plantas que apresentem tolerância ao herbicida é o primeiro passo na seleção de espécies potencialmente fitorremediadoras.

Portanto, é notável que a persistência de resíduos de herbicidas no solo podem intoxicar culturas semeadas em sucessão, não é desejável na atividade agrícola. Em razão disso, torna-se possível e recomendável o emprego de espécies vegetais que possam fitorremediar solos contaminados com herbicidas (Pires et al., 2003; Galon et al., 2014).

Diante disso objetivou-se com o trabalho avaliar o potencial de tolerância de espécies cultivadas no verão para fitorremediação de solo após a aplicação dos herbicidas fomesafen e sulfentrazone.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos em casa de vegetação na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim. Foram instalados dois experimentos, um com o herbicida fomesafen e outro com o sulfentrazone, durante os meses de novembro de 2015 a janeiro de 2016. As espécies de verão utilizadas com potencial fitorremediador foram: crotalária (*Crotalaria juncea*), milho (*Pennisetum glaucum*), mucuna preta (*Mucuna puriens*) e sorgo (*Sorghum bicolor*). Essas espécies foram selecionadas por apresentarem importância agrícola para o Estado do Rio Grande do Sul, onde são utilizadas como pastagens, cobertura do solo ou para a produção de grãos.

Foram instalados dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo o primeiro instalado com o herbicida fomesafen e o segundo com o sulfentrazone, marcas comerciais Flex<sup>®</sup> e Boral 500<sup>®</sup>, respectivamente. Ressalta-se que ambos os herbicidas são muito utilizados para o controle de plantas daninhas infestantes das culturas do fumo, soja, feijão, cana-de-açúcar, citros, dentre outras. Foram aplicadas doses de fomesafen (0,0; 0,125; 0,250 e 0,5 kg ha<sup>-1</sup>) e de sulfentrazone (0,0; 0,3; 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup>) sobre as espécies fitorremediadoras (crotalária, milho, mucuna e sorgo).

As espécies foram cultivadas em vasos de polietileno com capacidade para 8 dm<sup>3</sup> preenchidos com Latossolo vermelho aluminoférrico húmico (EMBRAPA, 2013). O solo foi coletado em profundidade de 0 a 20 cm, em área sem histórico de aplicação de herbicidas e caracterizado físico e quimicamente. Essa caracterização serviu de base para a correção do pH e para a adubação de acordo com as recomendações técnicas para as culturas (ROLAS, 2004). As características químicas e físicas do solo foram: pH em água de 4,8; MO = 3,5%; P= 4,0 mg dm<sup>-3</sup>; K= 117,0 mg dm<sup>-3</sup>; Al<sup>3+</sup>=0,6 cmolc dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup>= 4,7 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup>= 1,8 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC(t)= 7,4 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC(TpH=7,0)= 16,5 cmolc dm<sup>-3</sup>; H+Al= 9,7 cmolc dm<sup>-3</sup>; SB= 6,8 cmolc dm<sup>-3</sup>; V= 41%; e Argila= 60%.

A semeadura das espécies com potencial fitorremediador foi efetuada um dia antes da aplicação dos herbicidas. Os herbicidas foram aplicados, utilizando-se um pulverizador costal de precisão, equipado com duas pontas de pulverização da série TT 110.02, sendo pulverizado um volume de calda de 150 L ha<sup>-1</sup>. Após a germinação das espécies realizou-se o desbaste das mesmas deixando-se 10 plantas por vaso. A irrigação das plantas foi efetuada sempre que necessário.

As variáveis analisadas aos 30 dias após a emergência das plantas (DAE) foram: fitotoxicidade, altura, diâmetro de colmos e/ou caules, área foliar e massa seca da parte aérea das plantas. A fitotoxicidade foi determinada visualmente por dois avaliadores onde atribuíram notas de zero (ausência de injúria) e 100% (morte completa das plantas) de acordo com a metodologia da SBCPD (1995). A altura de planta foi aferida com régua graduada em centímetros, medindo-se desde rente ao solo até o ápice das últimas folhas completamente desenvolvidas. O diâmetro de caule foi determinado com paquímetro digital a 5 cm do solo. A área foliar foi aferida com medidor portátil de área foliar modelo CI-203 BioScience, quantificando-se todas as plantas presentes em cada tratamento. Após a determinação da área foliar as plantas foram alocadas em sacos de papel kraft e postas em estufa de circulação forçada de ar a uma temperatura de  $60 \pm 5$  °C até atingir massa constante para aferir a massa seca da parte aérea.

Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, em havendo significância aplicou-se regressões lineares ou não lineares para avaliar o efeito das doses dos herbicidas sobre as espécies estudadas. Ressalta-se que não foram efetuadas as comparações, para as variáveis testadas, entre as espécies por elas naturalmente apresentarem diferenças entre si. Todos os testes foram efetuados a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que a crotalária, o milho, a mucuna preta e o sorgo foram afetadas negativamente quando expostas a todas as doses de sulfentrazone onde não ocorreu a emergência das plantas, ou seja, houve a morte completa das mesmas (dados não apresentados). Madalão et al. (2013), ao aplicarem as doses de 800 e 1.600 g ha<sup>-1</sup> de sulfentrazone sobre duas espécies de sorgo, *Sorghum deeringianum* e *S. aterrimum* também relataram a eliminação de todas as plantas, o que corrobora aos resultados encontrado no presente estudo.

Observou-se que todas as espécies quando expostas ao fomesafen apresentaram aumento significativo da fitotoxicidade de acordo com o incremento das doses aplicadas (Figura 1). A aplicação da metade da dose e do dobro da dose recomendada (0,25 e 0,5 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente) de fomesafen ocasionou elevada fitotoxicidade as espécies, exceto para a mucuna preta que apresentou injúria inferior a 20%. Desse modo observou-se que a mucuna preta demonstra capacidade de tolerar o fomesafen enquanto que as demais espécies apresentaram fitotoxicidade acima de 90%, na dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup> (Figura 1).

Na Figura 2 observou-se efeito significativo na altura de plantas de acordo com o incremento das doses de fomesafen apenas à crotalária, ocorrendo a morte da planta com a

aplicação da maior dose do herbicida ( $0,5 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Para as demais espécies não houve efeito do incremento das doses do herbicida, mesmo usando-se o dobro da dose recomendada as mesmas não apresentaram severos efeitos do fomesafen. Procópio et al. (2005), ao trabalharem com a cultura do feijão também observaram que o uso de fomesafen + chlorimuron-ethy e fomesafen + cloransulam-methyl ocasionaram redução na altura de plantas das cultivares BRS Grafite e BRS Pérola, o que vem de encontro com os resultados encontrados na presente pesquisa.

Os resultados demonstram que o uso de fomesafen, em diferentes doses, não apresentou ajuste dos dados aos modelos sobre o diâmetro de caule das plantas avaliadas (Figura 3). Alguns herbicidas quando aplicados às plantas ocasionam o aumento do diâmetro do caule das plantas para tentarem se proteger do efeito fitotóxico dos mesmos, como foi observado também por Galon et al. (2016), sobre o diâmetro de colmos de sorgo após a aplicação de atrazina, herbicida inibidor do FS II. Meschede et al. (2008) denotaram o aumento no diâmetro das raízes de *Commelina benghalensis*, após a aplicação de glyphosate.

Observou-se que os valores de área foliar de três espécies ajustaram-se a equações, lineares – milho e não lineares - sorgo e crotalária (Figura 4). A maior redução de área foliar denotou-se para o sorgo, com cerca de 63%, quando comparada a ausência de aplicação, dose 0, do herbicida com a dose recomendada ( $0,25 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Para milho e a crotalária, as maiores injúrias apresentaram-se já no uso da metade da dose recomendada, ocorrendo o controle das mesmas ao serem expostas ao dobro da dose recomenda. Os valores de área foliar do milho se ajustou a equação linear, indicando que a redução da área foliar foi proporcional ao aumento das doses aplicadas. Na dose recomendada ocorreu redução de 27%, no entanto, diferente das demais espécies, quando em contato com o dobro da dose, não ocorrendo a morte das plantas. Ressalta-se que os resultados referentes a área foliar vão de encontro com os observados para a fitotoxicidade (Figura 4), ou seja, as maiores injúrias provocadas pelo herbicida expressaram os menores acúmulos de áreas foliares. Alguns trabalhos relatam que quando os herbicidas apresentam baixa fitotoxicidade, em ensaios relacionados a fitorremediação, normalmente as plantas usadas para essa técnica demonstram maior área foliar. Fato esse constatado por Belarmino et al. (2012) ao avaliarem as espécies *Lolium multiflorum*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, *Festuca arudinacea*, *Vicia sativa* e *Brassica napus* ao serem expostas a aplicação de imazapic + imazapyr nas doses de 140 e 280  $\text{g ha}^{-1}$ .

O acúmulo de massa seca da parte aérea diminui com o incremento das doses de fomesafen para crotalária e sorgo (Figura 5). Para as demais espécies de verão não foi verificado efeito significativo das doses do herbicida nessa variável. Observou-se que apenas

a mucuna preta tolerou ao dobro da dose do fomesafen, nas demais espécies ocorreu a morte de todas as plantas. Procópio et al. (2005), ao trabalharem com a fitorremediação após a aplicação do herbicida trifloxysulfuron-sodium, verificaram que houve redução no acúmulo de massa seca da parte aérea do feijão, proporcional ao aumento da dose do herbicida e com variação em relação as espécies *C. mucunoides*, *C. juncea*, *C. cajan*, *P. glaucum*, *S. guianensis*, *M. cinereum*, *M. aterrima*, *R. sativus* e *L. albus*.

Ao se comparar os resultados de massa seca com os de fitotoxicidade percebe-se o menor acúmulo de massa seca e de área foliar foram observados nas espécies com maiores índices de fitotoxicidade (Figuras 1, 4 e 5). Madalão et al. (2012), também relataram a ocorrência de redução do acúmulo da massa seca em função do aumento da fitotoxicidade ao cultivarem *Pennisetum glaucum*, em solo contaminado com sulfentrazone. O incremento nas características morfológicas e a baixa fitotoxicidade, mesmo com o aumento das doses de fomesafen, demonstra que a mucuna preta tem capacidade de ser usada como espécie fitorremediadora do herbicida.

A capacidade de espécies leguminosas em tolerar ou apresentaram capacidade de fitorremediação do solo, está diretamente relacionada a sua associação com microorganismos no solo, através de bactérias fixadoras de nitrogênio. Santos et al., (2007) também relataram que o cultivo de *Stizolobium aterrimum* até seu completo florescimento favoreceu o acúmulo de exsudatos na região das raízes, permitindo crescimento e desenvolvimento de maior número de grupos de microorganismos quando o solo foi tratado com o herbicida trifloxysulfuron-sodium.

A mucuna preta e a crotalária apresentaram as menores alterações das variáveis testadas, quando submetidas ao dobro da dose do herbicida fomesafen. A mucuna preta, o milho e o sorgo toleraram o herbicida fomesafen até a dose recomendada (0,25 kg ha<sup>-1</sup>). Entre os herbicidas testados, o sulfentrazone apresentou maior efeito tóxico sobre as espécies, ocasionando a morte das plantas mesmo com a aplicação da metade da dose recomendada.

## LITERATURA CITADA

Accioly, A.M.A., Siqueira, J.O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: Novais, R.F., Alvarez V.H., Schaefer, C.E.G.R. **Tópicos em ciência do solo**. 2008;1:299-352.

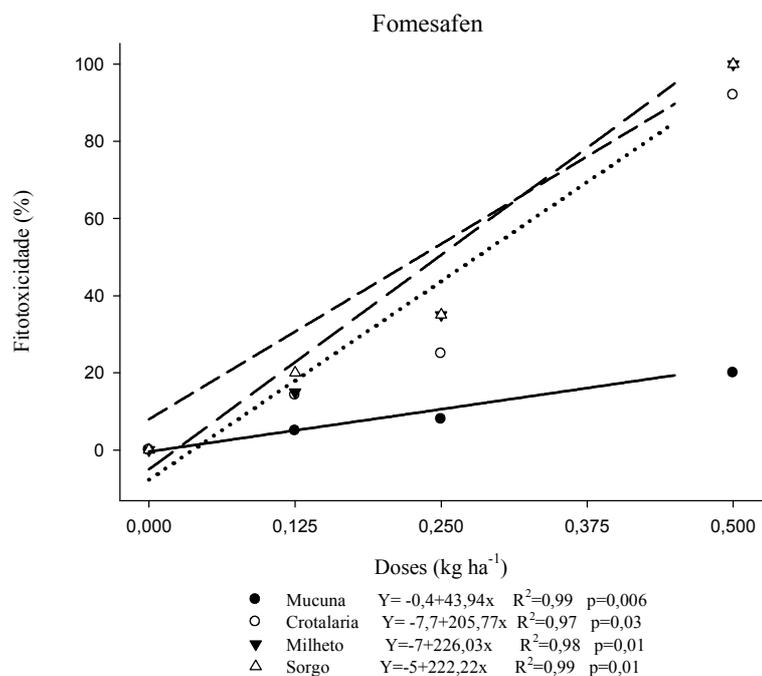
Belarmino, J.G. et al. **Seleção de espécies vegetais para fitorremediar solo contaminado com imazapic + imazapyr**. In: Congresso Brasileiro da Ciência Das Plantas Daninhas. 2012:158-62.

- Belo, A.F. et al. Fitorremediação de solo adubado com composto orgânico e contaminado com trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**. 2007;25;2:251-258.
- Carmo, M.L. et al. Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**. 2008;26;2:301-313.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3 ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013.
- Galon, L. et al. Influência de herbicidas do grupo das imidazolinonas em características fisiológicas de plantas cultivadas no inverno. **Pesquisa Agrop. Gaúcha**. 2014;20:42-51.
- Galon, L. et al. Selectivity and efficiency of herbicides in weed control on sweet sorghum. **Pesq. Agropec. Trop**. 2016;46;2:123-131.
- Madalão, J.C. et al. Susceptibilidade de espécies de plantas com potencial de fitorremediação do herbicida sulfentrazone. **Revista Ceres**. 2013;60:111-121.
- Madalão, J.C. et al. Uso de leguminosas na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Pesq. Agropec. Trop**. 2012;42;4:390-396.
- Meschede, D.K. et al. Baixas doses de glyphosate e seus efeitos no crescimento de *Commelina benghalensis*. **Rev. Bras. Herb**. 2008;7;2:53-58.
- Miller, R. R. Phytoremediation. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center, 1996.
- Newman, L.A. et al. Phytoremediation of organic contaminants: a review of phytoremediation research at the university of Washington. **Journal of Soil Cont**. 1998;7:531-542.
- Pires, F.R. et al. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**. 2003;21;2:335-341.
- Pires, F.R. et al. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **Rev. Bras. Ciência do Solo**. 2005;9;4:627-634.
- Prata, F., Lavorenti, A. Comportamento de herbicidas no solo: influência da matéria orgânica. **Rev. Bras. de Biociências**. 2000;6;2:17-22.
- Procópio, S.O. et al. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**. 2005;23:9-16.
- REDE OFICIAL DE LABORATÓRIOS DE ANÁLISE DE SOLO E DE TECIDO VEGETAL (ROLAS). Manual de adubação e calagem parágrafo OS Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 10. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004.
- Rodrigues B.N. e Almeida F.S. **Guia de herbicidas**. 6.ed. Londrina: 2011. 697 p.
- Santos, G. et al. Carryover proporcionado pelos herbicidas S-metolachlor e trifluralin nas culturas de feijão, milho e soja. **Planta Daninha**. 2012;30;4:827-834.

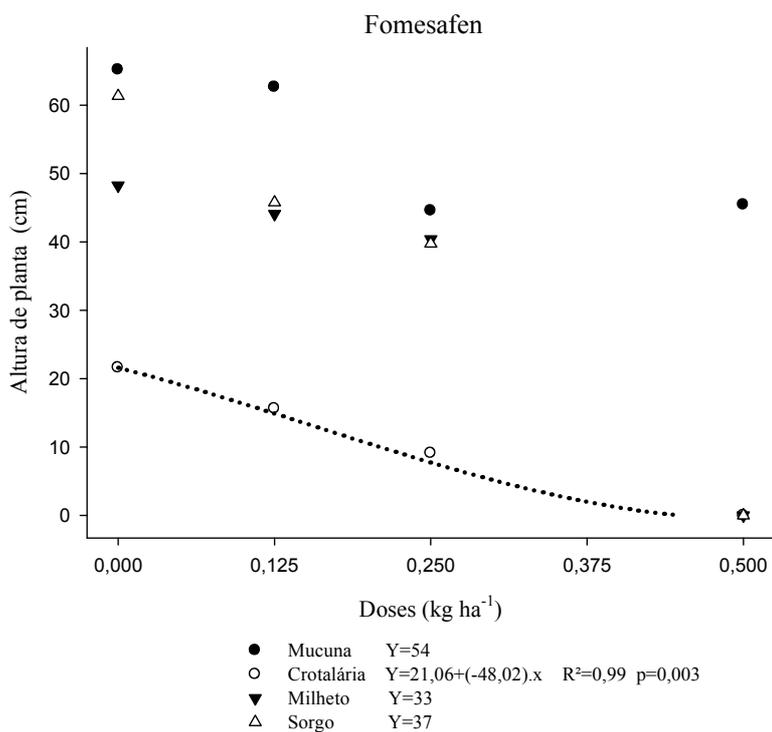
Santos, E. A. et al. Fitoestimulação por *Stizolobium aterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfurônio. **Planta Daninha**. 2007; 25; 2: 259-265.

SBCPD - SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas. Londrina: 1995. 42 p.

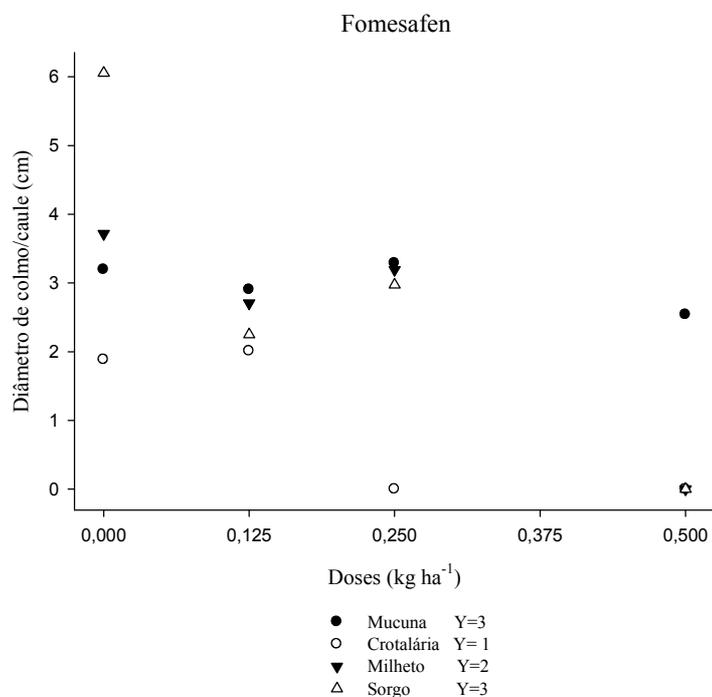
Vose, J.M. et al. Leaf water relations and sapflow in Eastern cottonwood (*Populus deltoides* Bartr.) trees planted for phytoremediation of a groundwater pollutant. **Intern. Journal Phytoremediation**. 2000;2:53-73.



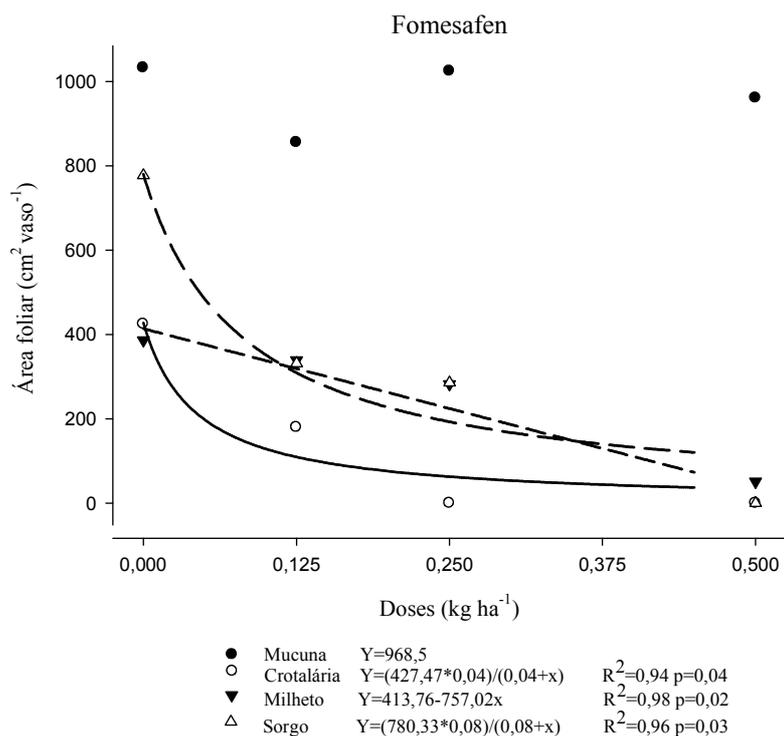
**Figura 1:** Fitotoxicidade (%) das espécies cultivadas no verão, crotalária, milheto, mucuna preta e sorgo, aos 30 dias após a emergência, em função da aplicação em pré-emergência de doses de fomesafen.



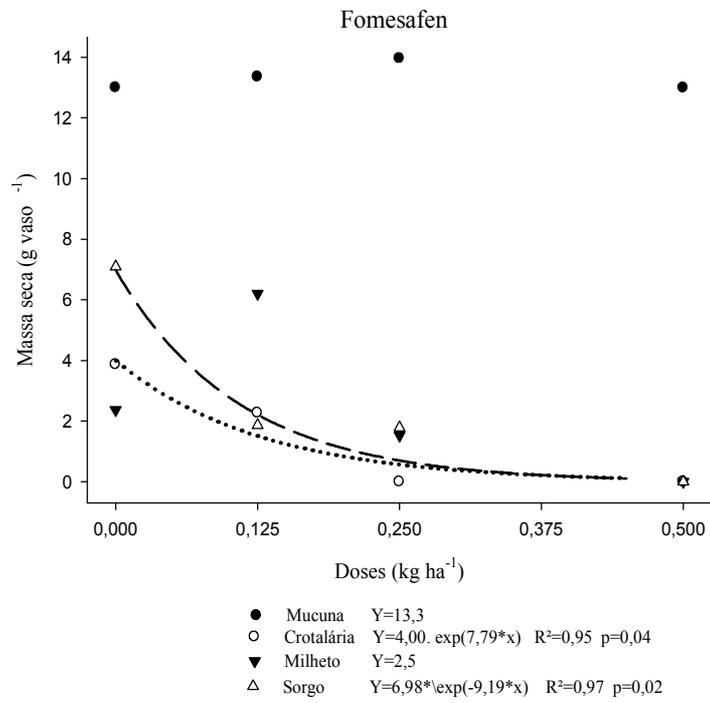
**Figura 2:** Altura de planta (cm) das espécies mucuna preta, crotalária, milheto e sorgo aos 30 dias após a emergência, em função da aplicação em pré-emergência de doses de fomesafen.



**Figura 3:** Diâmetro de colmos e/ou de caule (mm) das espécies mucuna preta, crotalária, milho e sorgo aos 30 dias após a emergência, em função de doses de fomesafen em pré-emergência.



**Figura 4:** Área foliar (cm<sup>2</sup> vaso<sup>-1</sup>) das plantas de mucuna preta, crotalária, milho e sorgo aos 30 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen em pré-emergência.



**Figura 5:** Massa seca da parte aérea (g vaso<sup>-1</sup>) das espécies mucuna preta, crotalaria, milheto e sorgo aos 30 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen em pré-emergência.

**Artigo 3**  
**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE PLANTAS HIBERNAIS COM**  
**POTENCIAL FITORREMEIADOR SOB INLUÊNCIA DOS HERBICIDAS**  
**INIBIDORES DA PROTOX**

**O artigo apresenta-se escrito sob as normas da revista Agroveterinária , para posterior  
submissão a mesma revista.**

# CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE PLANTAS HIBERNAIS COM POTENCIAL FITORREMEIADOR SOB INFLUÊNCIA DOS HERBICIDAS INIBIDORES DA PROTOX

## RESUMO:

O emprego de espécies vegetais para fitorremediação de solos contaminados com herbicidas persistentes, como os inibidores da enzima Protox, torna-se alternativa interessante dos pontos de vista econômico e ambiental. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de herbicidas inibidores de Protox, nas características relacionadas à fisiologia de espécies hibernais potenciais para aplicação como fitorremediadoras. Os ensaios foram instalados em casa de vegetação da Universidade Federal da Fronteira Sul, em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições. Foram aplicadas doses dos herbicidas fomesafen (0,0; 0,125; 0,250 e 0,5 kg ha<sup>-1</sup>) e/ou de sulfentrazone (0,0; 0,3; 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup>) em pré-emergência das espécies (aveia preta, cornichão, ervilhaca, nabo e tremoço). Aos 50 dias após a emergência das plantas, foram avaliados o índice de clorofila, taxa de fotossíntese, concentração interna de CO<sub>2</sub> no mesófilo foliar, CO<sub>2</sub> consumido, taxa de transpiração, condutância estomática, eficiência no uso da água, gradiente térmico e massa seca (g) da parte aérea. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F; em havendo significância, aplicou-se regressões lineares ou não lineares para avaliar o efeito das doses dos herbicidas sobre as espécies estudadas. Observou-se que o tremoço e a ervilhaca apresentaram os melhores resultados para todas as variáveis avaliadas, demonstrando assim potencial para serem testadas como potenciais fitorremediadoras de solos contaminados com os herbicidas fomesafen e sulfentrazone.

**Palavras chave:** Fomesafen; Sulfentrazone; *Lupinus albus*

## PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF WINTER CULTIVATED PLANTS WITH PHOTORMEDIATE POTENTIAL UNDER THE INHALENCE OF PROTOX INHIBITING HERBICIDES

### ABSTRACT:

The use of plant species for phytoremediation of soil contaminated with persistent herbicides becomes an interesting alternative both economically and environmentally. The objective of this work was to evaluate the influence of PROTOX inhibitor herbicides, on the characteristics related to the physiology of winter species, for potential application in phytoremediation. The experimental design was completely randomized, arranged in a 5 x 4 factorial scheme with four replications. Factor A was composed of phytoremediation species; And the B was composed of the doses of fomesafen (0, 0.125, 0.25 and 0.5 kg ha<sup>-1</sup>), and the sulfentrazone (0, 0.3, 0.6 and 1.2 kg ha<sup>-1</sup>), commercial brands Boral 500® and Flex®, respectively, applied in pre-emergence of the cultures. At 50 days after plant emergence, the following variables were evaluated: chlorophyll index, photosynthesis rate, internal CO<sub>2</sub> concentration in leaf mesophyll, CO<sub>2</sub> consumed, transpiration rate, stomatal conductance of water vapors, water use efficiency and gradient Thermal dry mass (g) of shoot. The data were submitted to analysis of variance by the F test, where linear or non linear regressions were applied to evaluate the effect of herbicide doses on the species studied. It was observed that tremoço and ervilhaca presented the best results for all evaluated variables, thus

demonstrating potential to be used as phytoremediation species of soil contaminated with the herbicides fomesafen and sulfentrazone.

**Keywords:** Fomesafen, Sulfentrazone, *Lupinus albus*

## INTRODUÇÃO

O aumento no consumo de agrotóxicos, principalmente herbicidas, utilizados no controle de plantas daninhas requer cuidado, pois pode causar danos ambientais e prejudicar a produtividade das culturas. A permanência de alguns herbicidas no solo por longos períodos pode provocar *carryover*, apresentando maiores riscos de contaminação do ambiente, seja por lixiviação, volatilização e erosão (Inoue et al. 2008, Oliveira Jr. et al. 2011).

Os herbicidas fomesafen e sulfentrazone, inibidores da enzima Protox (Duke et al. 1991, Hess 2000, Silva et al. 2007), são muito utilizados no Brasil nas culturas de cana-de-açúcar, soja, citros, café e florestas, apresentam elevada persistência e potencial de contaminação ambiental (Rodrigues & Almeida 2011). Estes herbicidas afetam diversos processos fisiológicos da planta, alterando os mecanismos de fechamento estomático e ocasionando peroxidação de membranas celulares (Taiz & Zeiger, 2013), dentre outros efeitos.

Várias alternativas para descontaminação de solos tratados com herbicidas foram testadas, dentre elas a utilização de enzimas, microrganismos e bombeamento, mas a técnica de fitorremediação tem ganhado destaque (Marques 2005, Marques et al. 2011). As vantagens da técnica são inúmeras, melhorando a qualidade do solo, evitando a lixiviação para águas superficiais e subterrâneas. Desse modo pode-se diminuir a possibilidade de se encontrar resíduos em alimentos e principalmente aumentar a produtividade dos sistemas agrícolas, em direção a uma agricultura mais sustentável (Moosavi & Seghatoleslami 2013).

As características dos herbicidas inibidores da Protox alteram a fisiologia das plantas e consequentemente a capacidade fotossintética, a transpiração, a eficiência de carboxilação e o uso de água, parâmetros que podem indicar o efeito de herbicidas nas plantas (Vargas et al. 2014). As diferenças genéticas entre espécies podem ser avaliadas quanto as alterações na condutância estomática, taxa transpiratória, temperatura da folha e acúmulo de massa seca quando essas são tratados com herbicidas (Galon et al. 2010).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência de herbicidas inibidores de Protox, nas características relacionadas à fisiologia de espécies de inverno, como o primeiro passo para testá-las quanto ao potencial de aplicação na fitorremediação de solos contaminados com resíduos destes herbicidas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos em casa de vegetação da Universidade Federal da Fronteira Sul, Câmpus Erechim entre os meses de outubro e dezembro de 2015. Foram instalados dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo o primeiro instalado com o herbicida fomesafen e o segundo com o sulfentrazone. Ressalta-se que ambos os herbicidas são muito utilizados para o controle de plantas daninhas infestantes das culturas da soja, feijão, cana-de-açúcar e florestas.

A semeadura das espécies foi efetuada em vasos de polietileno com capacidade para 8 dm<sup>3</sup> preenchidos com Latossolo Vermelho alumino-férrico húmico (EMBRAPA 2013) proveniente de área livre de aplicação de herbicidas, um dia antes da aplicação. A correção da fertilidade do solo foi efetuada com base na análise química do mesmo e de acordo com as recomendações técnicas para as culturas envolvidas nos ensaios (ROLAS, 2004). As características químicas e físicas do solo foram: pH em água de 4,8; MO = 3,5%; P= 4,0 mg dm<sup>-3</sup>; K= 117,0 mg dm<sup>-3</sup>; Al<sup>3+</sup>=0,6 cmolc dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup>= 4,7 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup>= 1,8 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC(t)= 7,4 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC(TpH=7,0)= 16,5 cmolc dm<sup>-3</sup>; H+Al= 9,7 cmolc dm<sup>-3</sup>; SB= 6,8 cmolc dm<sup>-3</sup>; V= 41%; e Argila= 60%.

Foram aplicadas doses de fomesafen (0,0; 0,125; 0,250 e 0,5 kg ha<sup>-1</sup>) e de sulfentrazone (0,0; 0,3; 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup>) sobre espécies hibernais (aveia preta – *Avena strigosa*, cornichão – *Lotus corniculatus*, ervilhaca – *Vicia sativa*, nabo – *Raphanus sativus* e tremoço – *Lupinus albus*), em pré-emergência. Os herbicidas foram aplicados utilizando-se pulverizador costal de precisão, equipado com duas pontas de pulverização da série TT 110.02, o qual pulverizou volume de calda de 150 L ha<sup>-1</sup>.

A semeadura das espécies ocorreu um dia antes da aplicação dos herbicidas, sendo que após a germinação efetuou-se o desbaste das mesmas deixando-se dez plantas por vaso. A irrigação foi controlada diariamente nas unidades experimentais, mantendo-se a umidade em torno de 80% da capacidade de campo.

As variáveis relacionadas a fisiologia das plantas foram avaliadas aos 45 dias após a emergência. Para aferir o teor de clorofila (TC) foi utilizado um clorofilômetro portátil modelo SPAD 502 – Plus, determinando-se as medidas em cinco pontos de cada planta nas folhas inferiores, medianas e superiores do dossel. Já a taxa fotossintética (A -  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub> -  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), quantidade de CO<sub>2</sub> consumido (QT -  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), taxa de transpiração (E -  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática de vapores de água (GS -  $\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), eficiência de carboxilação (EC-  $\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), uso eficiente da água (EUA -  $\text{mol CO}_2 \text{mol H}_2\text{O}^{-1}$ ) e temperatura da folha  $\Delta T$  (°C) foram aferidos no terço médio da primeira folha completamente expandida das plantas. A eficiência da carboxilação (EC – mol

$\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e a eficiência do uso da água (EUA -  $\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ) foram calculadas a partir da razão das variáveis  $A/C_i$  e  $A/E$ , respectivamente. Para isso foi utilizado um analisador de gases no infravermelho (IRGA), marca ADC, modelo LCA PRO (Analytical Development Co. Ltd, Hoddesdon, UK), sendo que cada bloco foi avaliado sob iluminação natural em um dia, entre oito e dez horas da manhã em condições de céu limpo, de forma que se mantivessem as condições ambientais homogêneas durante as análises.

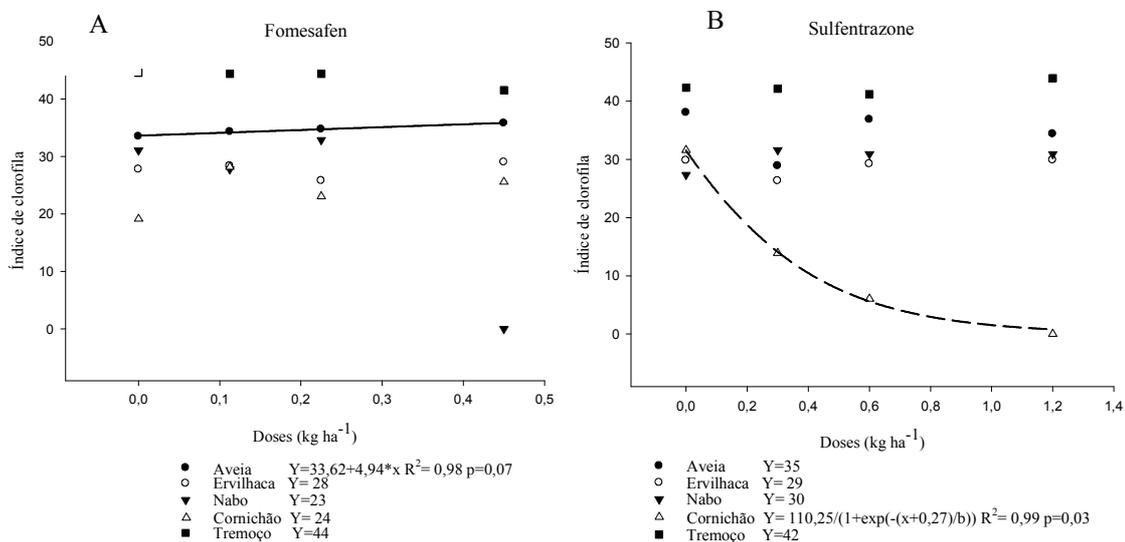
Após as avaliações das variáveis fisiológicas, coletou-se a parte aérea das plantas para secagem em estufa de circulação forçada de ar a  $65 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , para determinação da massa seca da parte aérea (MS).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, em havendo significância plotou-se regressões lineares ou não lineares para avaliar o efeito das doses dos herbicidas sobre as espécies estudadas. Ressalta-se que não foram efetuadas as comparações entre as espécies. Todos os testes foram efetuados a  $p \leq 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Ocorreu efeito da aplicação das doses de sulfentrazone e de fomesafen sobre as variáveis fisiológicas estudadas para aveia-preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço (Figuras 1 a 9).

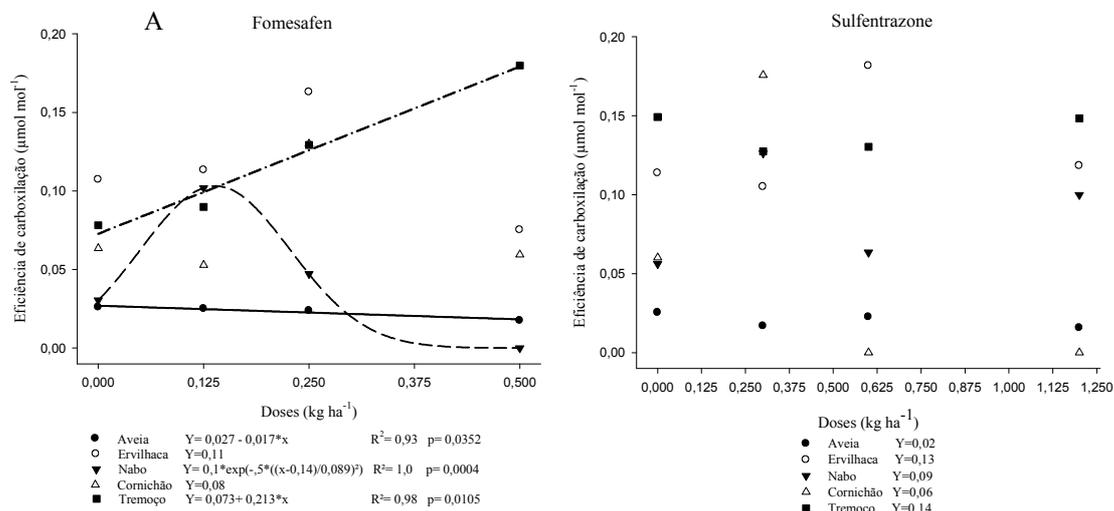
Observou-se que não houve alteração no índice de clorofila (SPAD) com o aumento nas doses de fomesafen (Figura 1A) para nenhuma espécie. Similarmente, o sulfentrazone também não afetou os teores de clorofila para nenhuma espécie exceto cornichão (Figura 1B). Resultados semelhantes foram encontrados por Brighenti (2012) que não observou diferença significativa nos teores de clorofila (SPAD) em plantas de girassol submetidas a diferentes doses de diversos herbicidas, enquanto a aplicação de doses dos herbicidas clomazone, ametryn e mistura comercial de clomazone + ametryn, observou-se reduziram o conteúdo de clorofilas entre 3 e 7 dias após a aplicação nas cultivares SP81-3250 e RB855156 (Arantes et al. 2013). No entanto os mesmos autores relatam ainda que as folhas recuperaram-se dos sintomas de injúrias aos 21 dias após a aplicação do herbicida, recuperando a cor verde.



**Figura 1:** Índice de clorofila (SPAD) das espécies de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremeço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B). UFFS, Erechim/RS, 2015.

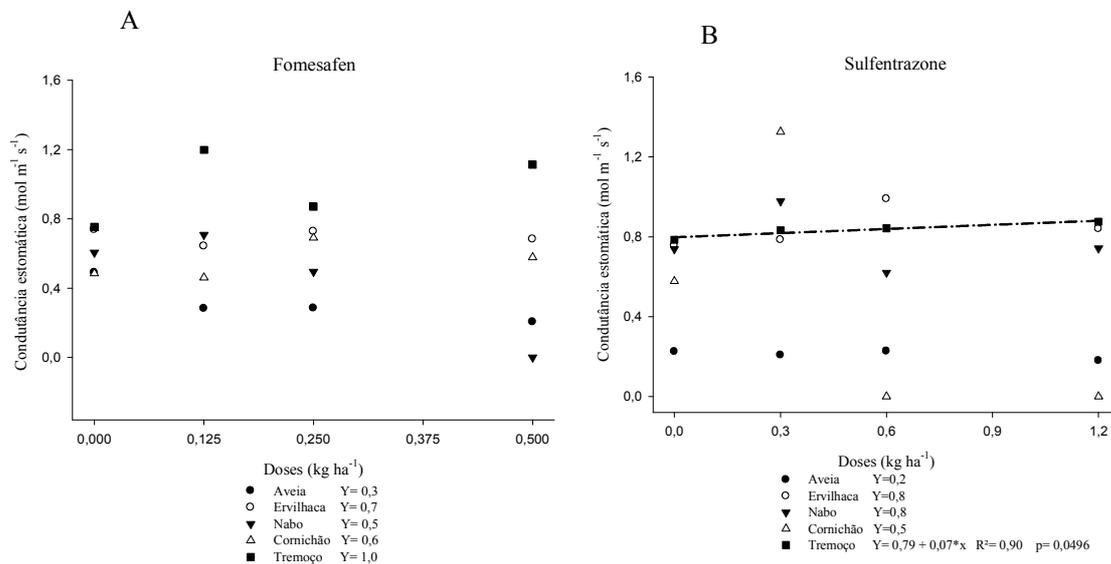
O tremeço apresentou aumento significativo na eficiência da carboxilação (EC) conforme o aumento das doses de fomesafen. Ocorreu diminuição significativa para o nabo na dose de 0,125 kg ha<sup>-1</sup> na EC, enquanto que para a dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup> houve a morte das plantas (Figura 2A). Vargas et al. (2014) observaram que a aplicação de glyphosate afetou negativamente os parâmetros fotossintéticos de buva suscetível, causando total inibição da eficiência da carboxilação e da eficiência do uso da água, a partir dos 7 dias após aplicação do herbicida. Já para a buva resistente ao herbicida, não se observou inibição dos parâmetros fotossintéticos.

As espécies submetidas ao sulfentrazone não demonstraram diferenças significativas na EC com o incremento das doses do herbicida (Figura 2B). De acordo com Long et al. (2006) a eficiência na carboxilação, representa a atividade da enzima rubisco. O aumento da concentração de CO<sub>2</sub> dentro da folha induz o aumento na eficiência fotossintética, inibindo a atividade da enzima. Muito provavelmente este foi também o mecanismo que aumentou a EC de tremeço com aplicação de fomesafen, onde pode ter ocorrido redução do influxo de CO<sub>2</sub> para a folha, menor C<sub>i</sub>, e conseqüentemente maior atividade da Rubisco para tentar manter a taxa fotossintética.



**Figura 2:** Eficiência de carboxilação (EC -  $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) das espécies de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremçoço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B). UFFS, Erechim/RS, 2015.

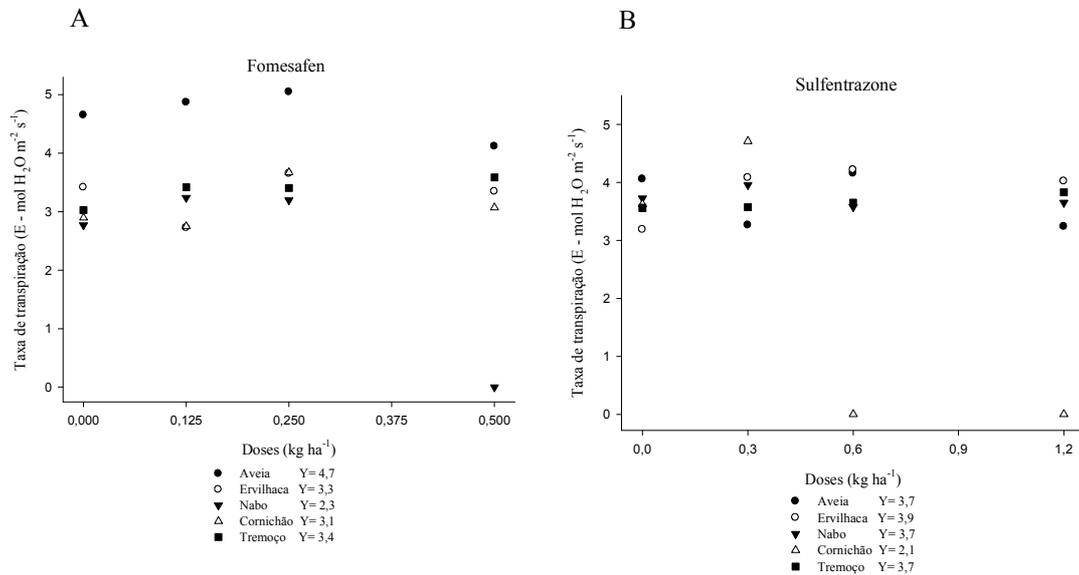
A condutância estomática de vapores de água (Gs) apresentou comportamento semelhante a eficiência de carboxilação (EC) e a taxa de transpiração (E) tanto para as plantas que receberam a aplicação de fomesafen quanto para as que foram tratadas com sulfentrazone. Neste último herbicida apenas o tremçoço apresentou diferença significativa na condutância estomática (Gs) em relação a aplicação da dose  $0 \text{ g ha}^{-1}$ , apresentando comportamento linear (Figura 3B). Resultados semelhantes foram observados por Galon et al. (2014) em que plantas de azevém submetidas a dose recomendada de imazethapyr + imazapic apresentaram aumento na E e na Gs. Plantas de trevo-branco, por outro lado, apresentaram redução nestas variáveis ao se aplicar o imazethapyr + imazapic no dobro da dose recomendada, e a ervilhaca ao se usar a dose e o dobro na dose recomendada (Galon et al., 2014).



**Figura 3:** Condutância estomática de vapores de água ( $G_s$ -  $\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) das espécies de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B). UFFS, Erechim/RS, 2015.

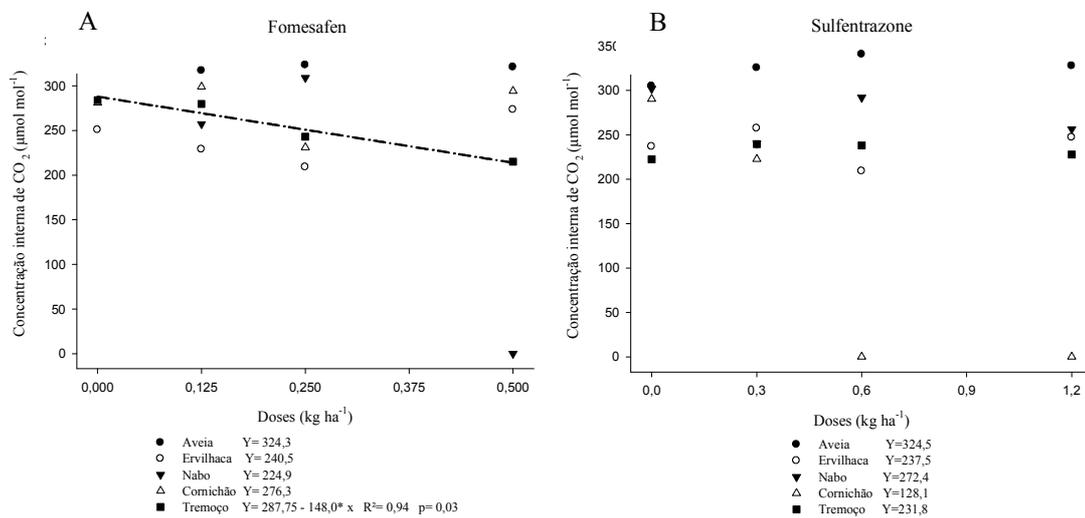
A condutância foliar é composta em pequena parte pela condutância cuticular da epiderme e, quando os estômatos estão abertos, pela  $G_s$  e logo as células-guarda dos estômatos é que passam a controlar o processo. Deste modo, a  $G_s$  é proporcional ao número e tamanho dos estômatos e diâmetro da abertura destes, características estas que dependem de fatores endógenos e ambientais de cada espécie avaliada (Brodribb & Holbrook, 2003).

Belo et al. (2011), ao trabalharem com os efeitos do picloram em diferentes espécies, observaram que a taxa transpiratória ( $E$ ) não foi alterada em *Zea mays*, independentemente das doses utilizadas do herbicida. Enquanto que, *Brachiaria decumbens*, *Eleusine coracana* e *B. brizantha* apresentaram redução da  $E$  à medida que aumentou a concentração de picloram no solo. Corroborando com os dados de  $G_s$  encontrados neste trabalho, Belo et al. (2011) observaram a redução da condutância estomática ( $G_s$ ) em *B. decumbens*, *E. coracana* e *B. brizantha* com o aumento de picloram no solo. Para o milho, não ocorreu diferença significativa da condutância estomática entre as doses de picloram avaliadas.



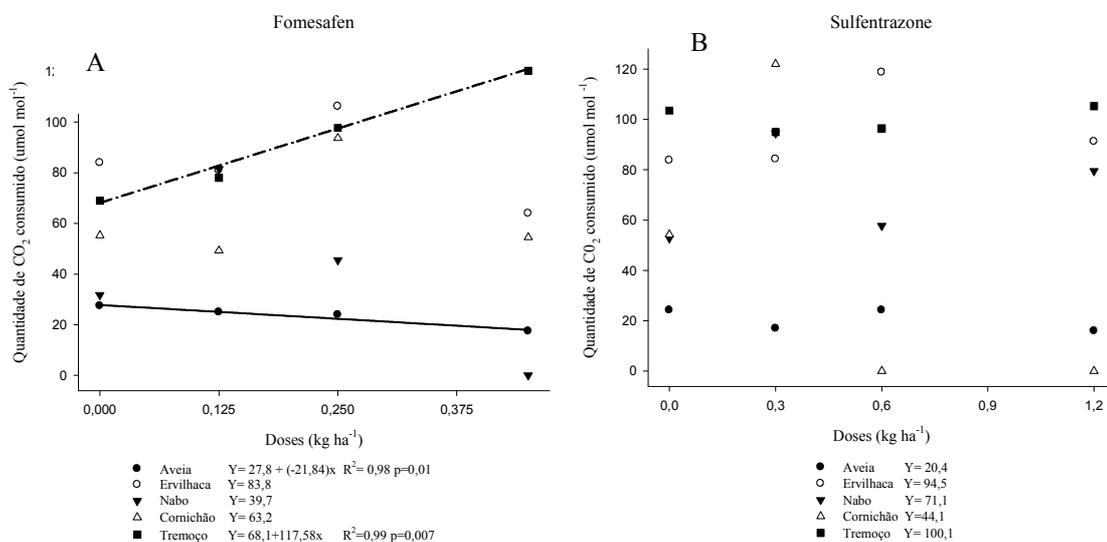
**Figura 4:** Taxa de transpiração ( $E - \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) das espécies aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B). UFFS, Erechim/RS, 2015.

O fomesafen causou redução linear na concentração interna de  $\text{CO}_2$  em relação ao aumento das doses do herbicida para o tremoço (Figura 5), estando de acordo com o observado para EC (Figura 2). As demais espécies não apresentaram efeito na presença do fomesafen. Essa concentração menor de  $\text{CO}_2$  no espaço interno da folha pode ser devido à maior atividade fotossintética, com maior taxa de carboxilação, incorporando o  $\text{CO}_2$  a compostos orgânicos, ou ainda devido à resistência da condutância estomática (Belo et al. 2011), explicando a capacidade do tremoço em melhor aproveitar o carbono para fotossíntese. Ao serem submetidas às doses de sulfentrazone, a aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço não apresentaram diferenças significativas quanto a concentração interna de  $\text{CO}_2$  (Figura 5B).



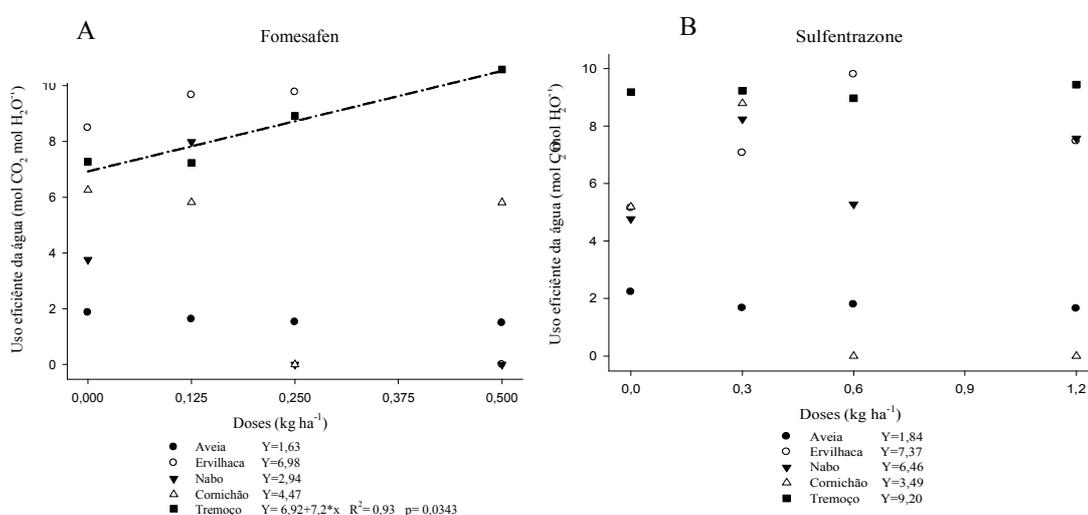
**Figura 5:** Concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci- μmol mol<sup>-1</sup>) das espécies aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B). UFFS, Erechim/RS, 2015.

A quantidade de CO<sub>2</sub> consumido aumentou linearmente para o tremoço, conforme o incremento das doses de fomesafen, demonstrando um efeito positivo em seu metabolismo, gerando capacidade de tolerância ao aumento nas doses de fomesafen aplicadas. O mecanismo exato envolvido neste comportamento não foi elucidado, mas pode envolver eventos como a fotorrespiração. Para a aveia preta ocorreu o inverso, observando-se uma diminuição linear na quantidade de CO<sub>2</sub> consumido (Figura 6A), assim como evidenciado na eficiência de carboxilação (Figura 2A). As plantas submetidas ao sulfentrazone não apresentaram diferenças significativas em relação a testemunha, mesmo com a aplicação da maior dose do herbicida (Figura 5B). Resultados similares foram observados em girassol, feijão-de-porco e amendoim, ocorrendo redução no gradiente de CO<sub>2</sub>, cultivadas em solo tratado com sulfentrazone em relação ao tratamento sem herbicida, com diminuição dos valores conforme aumento da concentração de sulfentrazone no solo. Já para a espécie Lab Lab não ocorreu redução no gradiente de CO<sub>2</sub> (Belo et al. 2016).



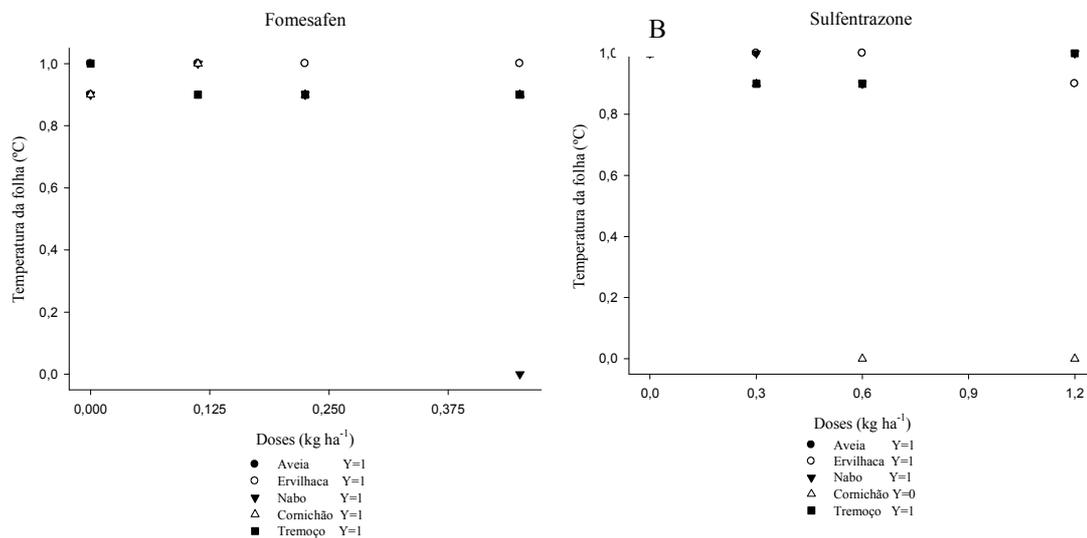
**Figura 6:** Quantidade de CO<sub>2</sub> consumido ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) das espécies aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B). UFFS, Erechim/RS, 2015.

O tremoço apresentou maior eficiência no uso da água, com um aumento de 45%, na dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen; já aveia preta, nabo, cornichão e ervilhaca não apresentaram diferenças significativas, com médias de 1,63; 6,98; 2,94 e 4,47, respectivamente (Figura 7A). Para o herbicida sulfentrazone as plantas também não apresentaram diferenças significativas para o uso eficiente da água, conforme o aumento das doses. Também não foi observado diferenças significativas no uso eficiente da água em azevém, cornichão, trevo-branco, festuca, ervilhaca e canola, após aplicação de imazethapyr+imazapic e imazapic+imazapyr (Galon et al. 2014).



**Figura 7:** Uso eficiente da água (UEA- mol CO<sub>2</sub> mol H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>) das espécies aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B). UFFS, Erechim/RS, 2015.

As espécies testadas não diferiram significativamente em relação a testemunha com relação ao gradiente de temperatura da folha e do ambiente, para os dois herbicidas testados, ocorrendo variações de cerca de 1°C. Galon et al. (2010) ao avaliarem diferentes genótipos de cana de açúcar submetidos a aplicação de ametrina, trifloxysulfuron-sodium e a mistura comercial de ametrina + trifloxysulfuron-sodium não observaram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que as variações no gradiente térmico foram em torno de 2,5°C. O gradiente térmico ( $\Delta T$ ) pode estar relacionando a intensidade metabólica do vegetal, expressando quantos graus a temperatura da folha se encontrava acima da temperatura ambiente no momento da avaliação (Concenço et al. 2007, Concenço et al. 2009).

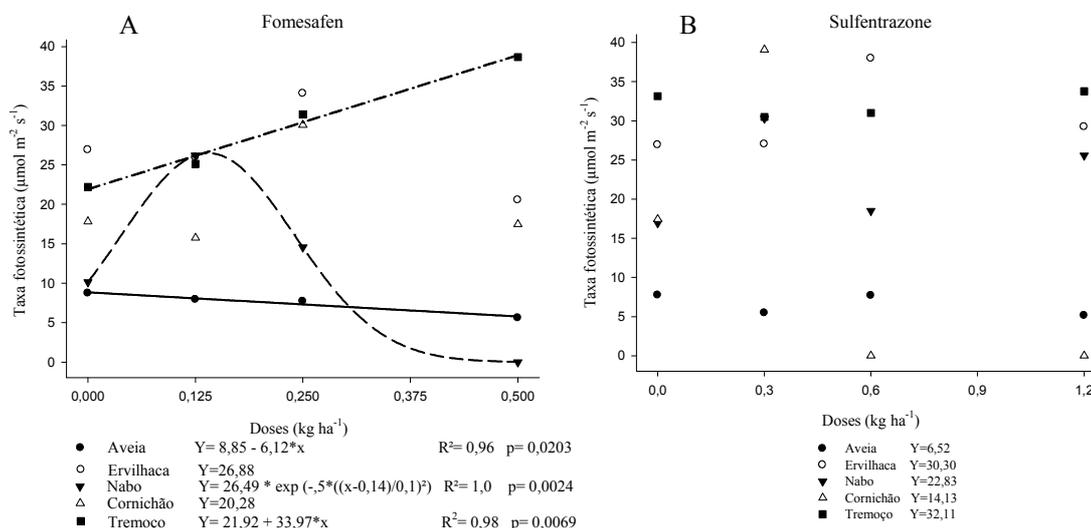


**Figura 8:** Variação da temperatura da folha em relação ao ambiente ( $\Delta T$ - °C) das espécies de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B). UFFS, Erechim/RS, 2015.

A diminuição na taxa de transpiração está associada ao fechamento dos estômatos, e as variações na abertura dos mesmos causando alterações no potencial hídrico (Brodrribb & Hill, 2000). A diminuição dos níveis de luminosidade ocasiona o fechamento dos estômatos, pois a luz está abaixo da radiação fotossinteticamente ativa ou para evitar o estresse hídrico (Cochard et al. 2002). Todas as variáveis estão diretamente relacionadas, como por exemplo, o gradiente de temperatura da folha e do ambiente é alterado pela E. A Gs é ativa quando os estômatos estão abertos para a captura de CO<sub>2</sub> e para a transpiração (Galon et al. 2010).

O tremoço demonstrou aumento crescente na atividade fotossintética com o incremento das doses de fomesafen (Figura 9A). O nabo apresentou aumento significativo na taxa fotossintética ao se aplicar 0,125 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen, ocorrendo redução no uso de 0,25 kg ha<sup>-1</sup> e morte das plantas com o uso de 0,5 kg ha<sup>-1</sup>. Isto indica que, em subdoses de fomesafen, esta espécie é capaz de promover alterações no seu metabolismo primário de forma a reduzir o impacto do herbicida sobre a fotossíntese. Galon et al. (2014) já relataram redução da taxa fotossintética de ervilhaca e trevo-branco, quando tratados com a dose e o dobro da dose recomendada de imazethapyr + imazapic, porém ocorreu aumento da taxa fotossintética com a aplicação da dose recomendada. A taxa fotossintética da aveia-preta sofreu diminuição com o aumento das doses de fomesafen (Figura 9A). Na avaliação das plantas de ervilhaca e cornichão não foi observado diferença significativa quanto a taxa fotossintética. As plantas submetidas ao herbicida sulfentrazone não apresentaram diferenças significativas, quanto a taxa fotossintética (Figura 9B). Uma relação negativa entre a concentração do picloram no solo e a taxa fotossintética foi observada nas espécies B.

*decumbens* e *B. brizantha*, apesar de estas terem apresentado preliminarmente tolerância a esse herbicida. *E. coracana* e *Zea mays*, não apresentaram alterações na taxa fotossintética quando cultivadas em solo com diferentes concentrações do picloram. A diminuição da taxa fotossintética pode estar relacionada com as trocas gasosas e a diminuição da clorofila, esta última diretamente relacionada com o mecanismo de ação do herbicida (Belo et al. 2011).

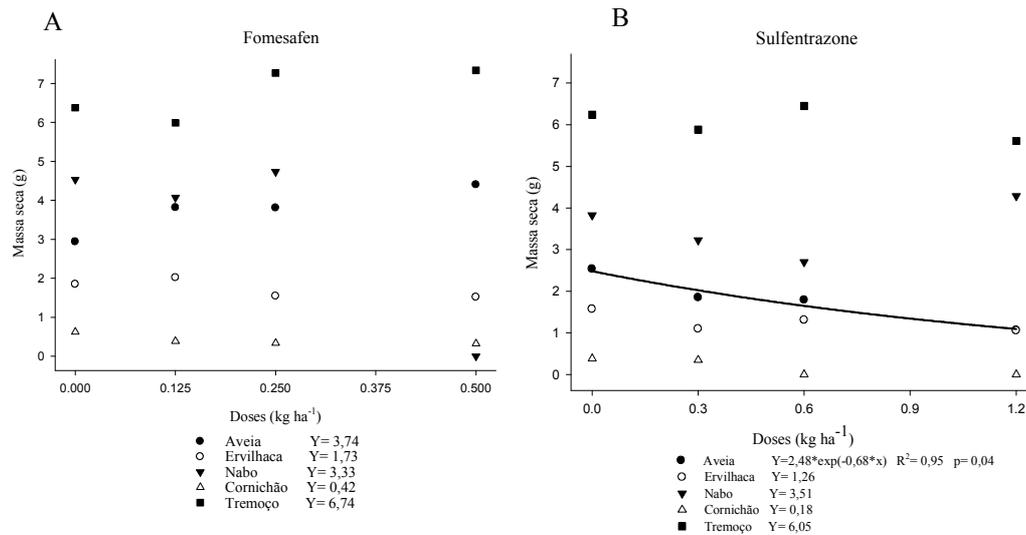


**Figura 9:** Atividade fotossintética ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) das espécies de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B). UFFS, Erechim/RS, 2015.

A ervilhaca, o tremoço, o nabo e o cornichão não apresentaram diferenças significativas em relação a massa seca da parte aérea quando se aplicou o fomesafen. A aveia preta apresentou redução no acúmulo de MS com o incremento das doses de sulfentrazone (Figura 10B). Belo et al. (2011) observaram que o picloram não interferiu na produção de massa seca da parte aérea das espécies *B. brizantha*, *B. decumbens*, *E. coracana* e *Zea mays*. Porém em trabalho de Galon et al. (2014) os autores observaram que o azevém na presença de imazethapyr + imazapic apresentou redução na MS de 61 e 82% quando cresceu na presença da dose e do dobro da dose, respectivamente. Já com aplicação de imazapic + imazapyr houve redução de 82% com uso da dose recomendada, e morte total das plantas com aplicação do dobro da dose. A ervilhaca apresentou decréscimo no acúmulo de massa seca de 12 e 34% quando submetida a imazethapyr + imazapic e reduziu em 42 e 55% quando aplicou-se imazapic + imazapyr na dose e no dobro da dose, respectivamente.

Foi possível observar que a ervilhaca e o tremoço sofreram alterações em sua fisiologia, em especial na capacidade fotossintética ao serem submetidas a aplicação de elevadas doses dos herbicidas, mesmo assim alcançaram valores de massa seca equivalente as plantas sem aplicação de fomesafen e sulfentrazone (Figura 10A;B). Isso pode representar a

capacidade de tolerância das espécies quando submetidas a estresses, mesmo sofrendo alterações fisiológicas, foram capazes de aumentar a sua massa seca.



**Figura 10:** Massa seca da parte aérea (g vaso<sup>-1</sup>) das espécies aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço aos 45 dias após a emergência, em função da aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B). UFFS, Erechim/RS, 2015.

## CONCLUSÕES

Ocorreu pouco efeito do aumento das doses dos herbicidas sobre a fisiologia das plantas de aveia preta, ervilhaca e tremoço. Isso abre a possibilidade de testar essas espécies na fitorremediação de herbicidas, uma vez que elas foram pouco afetadas na sua fisiologia com o aumento das doses dos herbicidas.

O destaque foi o tremoço, que apresentou melhor comportamento e aumento na taxa fotossintética frente aos herbicidas avaliados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, a FAPERGS e o FINEp pela concessão de auxílio financeiro a pesquisa e pelas bolsas concedidas.

## REFERÊNCIAS

ARANTES, M. T. et al. Respostas fisiológicas de cultivares de cana-de-açúcar a herbicidas seletivos. *Bioscience Journal*, v. 29, p. 1206–1214, 2013.

BELO, A. F. et al. Atividade fotossintética de plantas cultivadas em solo contaminado com picloram. *Planta daninha*, v. 29, n. 4, p. 885-892, 2011.

- BRIGHENTI, A. M. Resistência do girassol a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 42, n. 2, p. 225-230, 2012.
- BRODRIBB, T. J.; HILL, R. S. Increases in water potential gradient reduce xylem conductivity in whole plants. Evidence from a low-pressure conductivity method. *Plant Physiology*, v. 123, p.1021–1028, 2000.
- BRODRIBB, T. J.; HOLBROOK, N M. Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiology*, v. 132, p. 2166-2173, 2003.
- CONCENÇO, G. et al. Uso da água em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) em condição de competição. *Planta daninha*, v. 25, n. 3, p. 449-455, 2007.
- CONCENÇO, G. et al. Uso da água por plantas de arroz em competição com biótipos de *Echinochloa crusgalli* resistente e suscetível ao herbicida quinclorac. *Planta daninha*, v. 27, n. 2, p. 249-256, 2009.
- COCHARD, H. et al. Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiology*, v. 128, p. 282-290, 2003.
- CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SCHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advanced Agronomy*, p. 55-114, 1996.
- DUKE, S. et al. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Science*, v. 39, p. 465-473, 1991.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária de Solos (Brasília, DF). Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa Produção de Informação; Brasília: Embrapa Solos, 2013. 154 p.
- GALON, L. et al. Eficiência de uso da água em genótipos de cana-de-açúcar submetidos à aplicação de herbicidas. *Planta daninha*, v. 28, n. 4, p. 777-784, 2010.
- GALON, L. et al. Influência de herbicidas do grupo das imidazolinias em características fisiológicas de plantas cultivadas no inverno. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v. 20, p. 42-51, 2014.
- HESS, F. D. Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science*, v. 48, n. 2, p. 160-170, 2002.
- INOUE, M. H. et al. Lixiviação e degradação de diuron em dois solos de textura contrastante. *Acta Scientiarum*, v. 30, p. 631-638, 2008.
- LONG, S. P. et al. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant Cell Environmental*, v. 29, n. 3, p. 315-330, 2006.
- MARQUES, M. Phytoremediation. In: KALMAR ECO TECH'05: Waste to energy, bioremediation and leachate treatment, Kalmar, 2005:19-26.

- MARQUES, M.; AGUIAR, C. R. C.; SILVA, J. J. L. S. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 35, p.1-11, 2011.
- MARQUES, M.; ROSA, G. S.; AGUIAR, C. C. R. Plants with potential for phytoremediation of oil-contaminated soil based on germination and biomass growth. In: NATO/ CCMS Workshop on Management of Industrial Toxic Waste, 4. 2006. 8p.
- MOOSAVI, S. G.; SEGHATOLESLAMI, M. J. Phytoremediation: A Review. *Advance in Agriculture and Biology*, v. 1, p.5-11, 2013.
- OLIVEIRA, R. S.; ALONSO, D. G.; KOSKINEN, W. C. Sorption-Desorption of Aminocyclopyrachlor in Selected Brazilian Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 2, p. 1103-1112, 2011.
- REDE OFICIAL DE LABORATÓRIOS DE ANÁLISE DE SOLO E DE TECIDO VEGETAL (ROLAS). Manual de adubação e calagem estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 10. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004.
- RODRIGUES B. N.; ALMEIDA F. S. Guia de herbicidas. 6.ed. Londrina: 2011. 697 p.
- SILVA, A.A. et al. Herbicidas: Classificação e mecanismo de ação. In: Silva, A.A.; Silva, J.F. (Eds.). Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa: Ed. UFV, 2007. p.63-81.
- VARGAS, L. et al. Glyphosate influence on the physiological parameters of *Conyza bonariensis* biotypes. *Planta Daninha*, v. 32, p. 151-159, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

**Artigo 4**  
**FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDAS**  
**INIBIDORES DE PROTOX POR ESPÉCIES DE INVERNO**

**O artigo apresenta-se escrito sob as normas da revista Pesquisa Agropecuária Tropical,  
para posterior submissão a mesma.**

## FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDAS INIBIDORES DE PROTOX POR ESPÉCIES DE INVERNO

RESUMO - Uma das alternativas para despoluir solos contaminados com resíduos de herbicidas é o emprego de espécies vegetais com potencial para fitorremediação. Sendo assim esse trabalho teve como objetivo verificar a eficiência de espécies de inverno na remediação de solo contaminado com fomesafen e sulfentrazone, utilizando pepino como espécie indicadora da presença de resíduo. O delineamento utilizado foi o completamente casualizado, arranjado em esquema fatorial 6 x 4, com quatro repetições. O fator A foi constituído pelas espécies fitorremediadoras; aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão, tremoço e uma testemunha sem cultivo prévio, e o B pelas doses de fomesafen (0,0; 0,125; 0,25 e 0,5 kg ha<sup>-1</sup>) ou sulfentrazone (0,0; 0,3; 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup>), marcas comerciais Flex<sup>®</sup> e Boral 500<sup>®</sup> respectivamente, aplicadas em pré-emergência das culturas. Após a colheita das espécies de inverno, nos mesmos vasos foram semeados o pepino como planta indicadora da presença ou não de herbicida no solo. Aos 30 dias após a emergência do pepino avaliou-se as variáveis; fitotoxicidade (%), área foliar (cm<sup>2</sup>), altura (cm) e massa seca da parte aérea (g) das plantas de pepino. O tremoço foi a espécie que apresentou a maior capacidade de fitorremediar solos contaminados com o fomesafen, até a dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup>, e sulfentrazone até a dose de 0,6 kg ha<sup>-1</sup>. A ervilhaca e o nabo também apresentaram potencial de fitorremediar o solo, porém, em níveis inferiores ao tremoço. O herbicida sulfentrazone apresentou os maiores efeitos tóxicos sobre a planta indicadora, o pepino.

PALAVRAS CHAVE: *Cucumis sativus*; carryover; fitorremediação.

PHOTOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH HERBICIDES PROTOX  
INHIBITORS OF WINTER SPECIES

ABSTRACT - One of the alternatives for the treatment of soils contaminated with herbicide residues is the use of plant species with potential for phytoremediation. Therefore, the objective of this work was to verify the efficiency of winter species in the remediation of soil contaminated with fomesafen and sulfentrazone, using cucumber as an indicator species. The design was completely randomized, arranged in a 6 x 4 factorial scheme, with four replications. Factor A was composed of phytoremediation species: *Avena sativa*, *Vicia sativa*, *Rapahus sativus*, *Lotus coriculatus* and *Lupinus albus* and a non-cultivated control; and factor B the herbicides doses (0.0, 0.125, 0.25 and 0.5 kg ha<sup>-1</sup>) or sulfentrazone (0.0, 0.3, 0.6 and 1.2 kg ha<sup>-1</sup>), trademarks Flex® and Boral 500® respectively, applied in pre-emergence of cultures. After a harvest of the winter species, the same pots were sown as the cucumber as a plant indicating the presence or not of herbicide in the soil. At 30 days after emergence of cucumber were evaluated as variables: phytotoxicity (%), leaf area (cm<sup>2</sup>), stem diameter (mm), height (cm) and dry mass of aerial part (g) of cucumber plants. *L. albus* shown capacity for phytoremediation of soils contaminated with fomesafen herbicide, up to a dose of 0.5 kg ha<sup>-1</sup>, and sulfentrazone up to a dose of 0.6 kg ha<sup>-1</sup>. *V. sativa* and *R. sativus* also showed potential phytoremediation of the soil, but at levels lower than *L. albus*. Among the tested herbicides sulfentrazone had the highest toxic effects on cucumber.

KEY-WORDS: *Cucumis sativus*; carryover; phytoremediation.

## INTRODUÇÃO

O aumento no consumo de agrotóxicos no Brasil, tem se dado pela infestação de insetos, doenças e plantas daninhas sobre as culturas, principalmente pelas características de clima, manejos e a extensão territorial que o país apresenta. Na atualidade o manejo das plantas daninhas tem se tornado problemático, em especial devido ao baixo controle das espécies tolerantes e resistentes aos herbicidas. Isto pode resultar na aplicação de maiores doses e também em alguns casos o uso de herbicidas que apresentam maior persistência no

solo. Alguns herbicidas podem permanecer no solo por longos períodos, provocando o chamado *carryover* nas culturas sucessoras, além de contaminar águas superficiais e subterrâneas, em função da lixiviação (Lavorenti et al. 2003). Dentre esses herbicidas destacam-se o fomesafen e o sulfentrazone, muito utilizados no Brasil para o controle de plantas daninhas infestante das culturas do feijão, soja, cana-de-açúcar, florestas, dentre outras, e que apresentam elevada persistência e potencial de contaminação ambiental (Rodrigues & Almeida 2011).

A eliminação dos herbicidas no solo acontece por diferentes processos e velocidades, com influência das propriedades físico-químicas da molécula, atributos do solo, pelas condições ambientais ou interação desses fatores (Vivian et al. 2006; Oliveira Júnior et al. 2006). Apesar de muitos processos envolvidos no comportamento dos herbicidas no ambiente ainda serem desconhecidos, o entendimento da interação solo-planta-herbicida é determinante na recomendação adequada para cada tipo de solo, com maior eficácia e menor contaminação (Oliveira Júnior et al. 2006).

A fitorremediação é uma estratégia para a remoção de compostos tóxicos do ambiente utilizando plantas para esse fim. É uma técnica economicamente viável e que proporciona menores impactos ambientais (Ali et al. 2013). A seletividade de espécies a determinados compostos é a base da fitorremediação, sendo que algumas plantas apresentam ocorrência natural de tolerância a alguns herbicidas. Os compostos orgânicos podem ser translocados para outros tecidos da planta e volatilizados; podem ainda sofrer degradação ou ser transformados em produtos menos tóxicos, especialmente menos fitotóxicos, combinados e/ou ligados a tecidos das plantas (Moosavi & Seghatoleslami 2013).

Muitos trabalhos tem sido desenvolvidos a fim de identificar plantas capazes de descontaminar solos poluídos com herbicidas (Pires et al. 2005; Santos et al. 2007; Madalão et al. 2012). Madalão et al. (2013) relatam as espécies *Dolichos lablab*, *Canavalia ensiformis* e *Crotalaria juncea* são capazes de descontaminar solo tratado com esse herbicida

sulfentrazone.

A utilização de plantas bioindicadoras na identificação de resíduos de herbicidas no solo e na identificação de espécies potencialmente fitorremediadoras, é uma técnica de simples utilização e avaliação. Espécies indicadoras devem apresentar características importantes relacionadas à alta taxa de crescimento, ausência de dormência e menor variabilidade genética. Essas características permitem a redução do erro nas avaliações, visualização rápida dos sintomas ocorridos e ampla distribuição geográfica (Nunes & Vidal, 2009). A exemplo de espécies indicadoras da presença de herbicidas residuais no solo destaca-se o pepino, utilizado em bioensaios (Braga et al. 2016). O pepino tem sido usado em bioensaios por ser muito sensível aos herbicidas, ter crescimento rápido e custo baixo (Nunes & Vidal 2009).

Diante do exposto objetivou-se com o trabalho verificar a eficiência de espécies de inverno na remediação de solo contaminado com fomesafen e sulfentrazone, utilizando pepino como espécie indicadora da presença de resíduo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os trabalhos foram conduzidos em casa de vegetação na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Câmpus Erechim/RS. Foram instalados dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado, arranjos em esquema fatorial 6 x 4, com quatro repetições, sendo o primeiro instalado com o herbicida fomesafen e o segundo com o sulfentrazone. O fator A foi constituído pelas espécies potencialmente fitorremediadoras; aveia preta (*Avena strigosa*), ervilhaca (*Vicia sativa*), nabo (*Raphanus sativus*), cornichão (*Lotus corniculatus*), tremoço-branco (*Lupinus albus*) e uma testemunha sem cultivo prévio, e o B pelas doses de fomesafen (0,0; 0,125; 0,250; 0,5 kg ha<sup>-1</sup>) e sulfentrazone (0,0; 0,3; 0,6 e 1,2 kg ha<sup>-1</sup>), marcas comerciais Flex<sup>®</sup> e Boral 500<sup>®</sup>, respectivamente, aplicadas em pré-emergência das culturas.

A semeadura das espécies fitorremediadoras foram efetuadas em vaso de polietileno com capacidade para volume de 8 dm<sup>3</sup> preenchidos com Latossolo Vermelho Alumino-férrico húmico (Embrapa 2013) proveniente de área livre da aplicação de herbicidas. A correção da fertilidade do solo foi efetuada com base na análise química do mesmo e de acordo com as recomendações técnicas para as culturas envolvidas nos ensaios. As características químicas e físicas do solo foram: pH em água de 4,8; MO = 3,5%; P = 4,0 mg dm<sup>-3</sup>; K= 117,0 mg dm<sup>-3</sup>; Al<sup>3+</sup>=0,6 cmolc dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup>= 4,7 cmolc.dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup>= 1,8 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC(t)= 7,4 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC(TpH=7,0) = 16,5 cmolc dm<sup>-3</sup>; H+Al= 9,7 cmolc dm<sup>-3</sup>; SB= 6,8 cmolc dm<sup>-3</sup>; V= 41%; e Argila= 60%. Após o preenchimento dos vasos e a semeadura das espécies aplicou-se os herbicidas com pulverizador costal de precisão, equipado com duas pontas de pulverização da série TT 110.02, o qual pulverizou um volume de calda de 150 L ha<sup>-1</sup>.

A semeadura das espécies com potencial fitorremediador ocorreu antes da aplicação dos herbicidas, sendo que após a germinação efetuou-se o desbaste deixando dez plantas por vaso. A irrigação foi controlada diariamente nas unidades experimentais, mantendo-se a umidade em torno de 80% da capacidade de campo. Aos 45 dias após a semeadura (DAS), as plantas foram seccionadas rente ao solo, e retiradas dos vasos. A seguir, utilizando-se o mesmo solo que se conduziu as plantas com potencial fitorremediador, esse foi peneirado, adubado de acordo com o recomendado para a cultura utilizada como bioindicadora da presença dos herbicidas fomesafen e sulfentrazone, o pepino cultivar Pioneiro. Foram semeadas 12 sementes de pepino por vaso na profundidade de 0,5 cm, sendo que após a emergência das plântulas, foi feito o desbaste, deixando-se 10 plantas por vaso.

Aos 7, 14, 21 e 28 dias após a emergência das plantas de pepino (DAE) avaliou-se a fitotoxicidade (%) do mesmo. A fitotoxicidade foi determinada visualmente por dois avaliadores onde atribuíram notas de zero (ausência de injúria) e 100% (morte completa das plantas) de acordo com a metodologia da SBCPD (1995). Após os 28 DAE foram determinadas a altura de plantas (cm), área foliar (cm<sup>2</sup>/vaso) e massa seca (g/vaso). A altura

de planta foi aferida com régua graduada em centímetros, medindo-se desde rente ao solo até o ápice das últimas folhas. A área foliar foi aferida com medidor portátil de área foliar modelo CI-203 BioScience em 5 plantas de cada tratamento. Após a determinação da área foliar as plantas foram acondicionadas em sacos de papel *kraft* e postas para secagem em estufa com circulação forçada de ar, a temperatura de  $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ , até o material atingir massa constante para aferir-se a massa seca da parte aérea da planta bioindicadora.

Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, em havendo significância aplicou-se regressões lineares ou não lineares para o fator quantitativo (doses) e o teste de comparação de média de Tukey para o fator qualitativo (espécies), para identificação das melhores espécies fitorremediadoras. Todos os testes foram efetuados a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fitotoxicidade aos 7 dias após a emergência (DAE) para as plantas de pepino aumentou com o incremento das doses de fomesafen somente quando se cultivou o cornichão, não sendo observado efeitos das doses desse herbicida para as demais espécies (Figura 1A), com índice máximo de 5%. As plantas de pepino sob aplicação do sulfentrazone, também nessa mesma época de avaliação apresentaram aumento significativo da fitotoxicidade quando semeadas sem a presença de plantas fitorremediadoras (Figura 1B), chegando em 100% na dose de  $1,2 \text{ kg ha}^{-1}$ . Madalão et al. (2012) ao avaliarem o potencial fitorremediador de *Crotalaria juncea*, *Canavalia ensiformis* e *Cajanus cajan* após a aplicação de sulfentrazone, utilizando milho como planta bioindicadora, observaram que o incremento nas doses desse herbicida aumentou os sintomas de fitotoxicidade sobre o milho. Na primeira avaliação, ocorreu 55,3% de fitotoxicidade com uso de  $200 \text{ g ha}^{-1}$ , e 78% na dose de  $400 \text{ g ha}^{-1}$ , quando cultivado após *C. juncea* (Madalão et al. 2012). Quando o milho foi cultivado em sucessão às espécies *C. cajan*, *C. cajan* e *C. ensiformis*, apresentou sintomas de fitotoxicidade acima de 90%, nas doses de 200 e  $400 \text{ g ha}^{-1}$  de sulfentrazone (Madalão et al. 2012). Pires et al. (2005)

observaram resultados similares ao avaliarem o potencial fitorremediador de *C. cajan*, *C. ensiformes*, *Dolichos lablab*, *Pennisetum glaucum*, *Estizolobium deeringianum*, *E. aterrimum* e *Lupinus albus* após aplicar o tebuthiuron, semeadas anteriormente a planta indicadora *Avena strigosa*. Os autores relataram menor fitotoxicidade do tebuthiuron sobre *A. strigosa* quando cultivada em sequência ao *P. glaucum*, *L. albus* e *C. cajan*, na dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup>.

Nas avaliações subsequentes, conforme o aumento da dose de fomesafen e de sulfentrazone sempre ocorreu aumento da fitotoxicidade do pepino, independentemente da planta fitorremediadora (Figuras 1C e 1D, Figuras 2A, 2B, 2C e 2D).

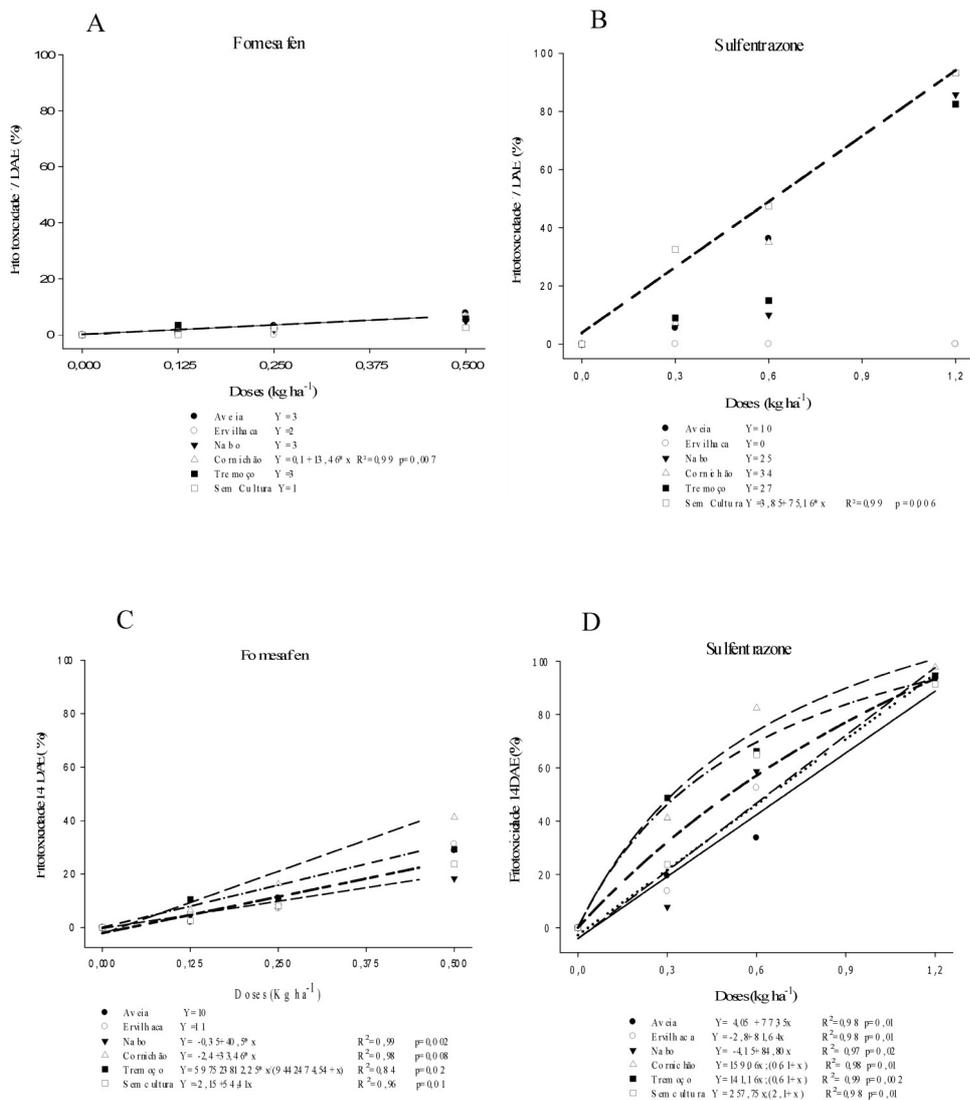


Figura 1. Fitotoxicidade às plantas de pepino (%), aos 7 (A e B) e 14 (C e D) dias após a emergência (DAE), em função da aplicação de doses de fomesafen e sulfentrazone e cultivo prévio de espécies potencialmente fitorremediadoras.

Pode-se observar que o fomesafen causa fitotoxicidade menor de 60% e o sulfentrazone causa fitotoxicidade acima de 80%, quando aplicado no dobro da dose, já a partir dos 14 DAE. Entretanto, na dose recomendada de fomesafen a fitotoxicidade foi menor que 20% em todos os períodos analisados (Figura 1C, Figuras 2A e 2C).

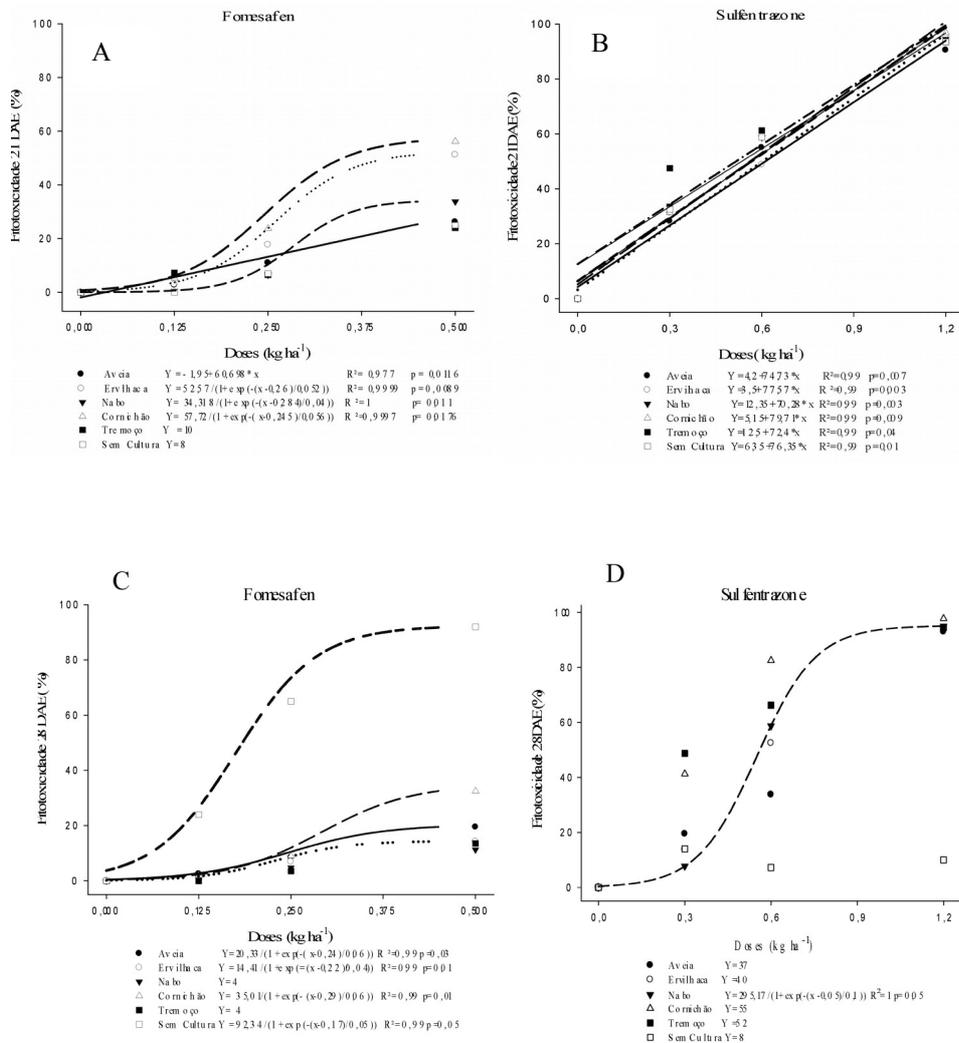


Figura 2. Fitotoxicidade às plantas de pepino (%), aos 21 (A e B) e 28 (C e D) dias após a emergência (DAE), em função da aplicação de doses de fomesafen e sulfentrazone e cultivo prévio de espécies potencialmente fitorremediadoras.

Corroborando com os resultados desse trabalho, alguns autores observaram que o aumento das doses de picloram incrementou a fitotoxicidade da planta de pepino em solo com pH 4,5 e cultivado em diferentes profundidades ao se usar *Brachiria brizantha* como espécie fitorremediadora. A fitotoxicidade das plantas de pepino foi maior com doses crescentes de picloram na camada superficial do solo com pH 5,6 com ou sem cultivo prévio de *B. brizantha* e naquelas com maior profundidade e sem cultivo prévio (Braga et al. 2016). A fitotoxicidade se manifesta em forma de clorose nas folhas e a morte das células fotossinteticamente ativas ocorrem em plantas submetidas aos herbicidas inibidores da enzima Prottox, de maneira que a enzima é responsável pela síntese da clorofila e do grupo heme (Rodrigues e Almeida, 2011). Sem a ação da enzima o protoporfirinogênio acaba acumulando

no citoplasma das células como protoporfirina. Nas células fotossintéticas e com a presença de O<sub>2</sub>, a protoporfirina favorece a formação de oxigênio *singlet* que age como radical livre, ao final ocorre peroxidação lipídica das membranas celulares, causando estresse a planta e até a morte (Hulting et al. 2001).

Aos 7 DAE as plantas de pepino submetidas a dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen, apresentaram baixos níveis de fitotoxicidade, sendo as plantas de pepino cultivadas em sucessão a aveia, cornichão, ervilhaca e nabo não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 1). Também na avaliação aos 7 DAE, quando submetidas a dose de 1,2 kg ha<sup>-1</sup> de sulfentrazone, as plantas de pepino cultivadas em sucessão ao nabo e a testemunha sem cultivo prévio apresentaram os maiores níveis de fitotoxicidade (ambas com 93%), em comparação as demais espécies, seguido pelas plantas de pepino cultivadas em sucessão a ervilhaca e tremoço (85 e 82%). As plantas de pepino cultivadas em sucessão a aveia preta e cornichão não apresentaram fitotoxicidade visual aos 7 DAE.

Aos 14 DAE observou-se aumento na fitotoxicidade nas plantas de pepino em todas as doses aplicadas de fomesafen, com relação a avaliação efetuada aos 7 DAE. Na dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen, as plantas de pepino cultivadas em sucessão apresentaram os maiores índices de fitotoxicidade em relação as demais plantas antecessoras ao pepino. No mesmo dia de avaliação (14 DAE) as plantas de pepino cultivadas em sucessão a testemunha sem cultivo, aveia preta, cornichão e tremoço não diferiram estatisticamente, apresentando níveis intermediários de fitotoxicidade, quando aplicada a dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen. Ainda para o mesmo herbicida a menor fitotoxicidade foi observada nas plantas de pepino cultivadas em sucessão a ervilhaca (Tabela 1).

Quando submetidas a maior dose de sulfentrazone (1,2 kg ha<sup>-1</sup>) as plantas de pepino cultivadas em sucessão a todas as espécies fitorremediadoras testadas e a testemunha sem cultivo prévio apresentaram altos níveis de fitotoxicidade, não diferindo entre si, quando avaliadas aos 14 DAE (Tabela 1).

Tabela 1. Fitotoxicidade (%) as plantas de pepino (*Cucumis sativus*), cultivadas em sucessão as espécies com potencial fitorremediador (aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão, tremoço e testemunha sem cultivo), avaliadas 7, 14, 21 e 28 dias após a emergência (DAE), posterior a aplicação de fomesafen e sulfentrazone.

Fomesafen	Dose (kg ha <sup>-1</sup> )	Test. em cultivo	Aveia preta	Ervilhaca	Nabo	Cornichão	Tremoço	C.V. (%)
Fitotoxicidade 7 DAE	0	0 a <sup>1</sup>	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	---
	0,125	0 c	0,75 bc	1,5 bc	2 ab	0 c	3,5 a	6,02
	0,25	2,25 a	3,25 a	1,75 ab	2 ab	0 b	3,50 <sup>a</sup>	43,45
	0,5	2,5 c	7,75 a	4,75 abc	6,25 ab	6,75 ab	3,5 bc	29,84
Fitotoxicidade 14 DAE	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	---
	0,125	2,5 b	2 b	4,25 b	6,5 ab	4 b	10,5 a	52,23
	0,25	8 b	11 b	8 b	16,25 b	7 b	11 b	18,86
	0,5	23,75 cd	28,75 bc	18,25 d	41,25 a	31,25 b	29,25 bc	10,16
Fitotoxicidade 21 DAE	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	---
	0,125	0 c	2,75 bc	0,5 c	5,25 ab	2,25 bc	7,25 a	50,67
	0,25	7 c	11 bc	6,5 c	23,75 a	17,75 ab	6,5 c	24,55
	0,5	25 b	26,25 b	33,75 b	56,25 a	51,25 a	25 b	17,26
Fitotoxicidade 28 DAE	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	---
	0,125	23,75 a	2,5 b	0,25 b	2 b	1 b	0b	40,00
	0,25	65 a	8,5 bc	4,75 bc	9 b	7 bc	3,5 c	14,17
	0,5	91,5 a	19,5 c	11,25 d	32,5 b	14,25 cd	13,5 cd	10,73
Sulfentrazone	Dose (kg ha <sup>-1</sup> )	Test. Sem cultivo	Aveia preta	Ervilhaca	Nabo	Cornichão	Tremoço	C.V. (%)
Fitotoxicidade 7 DAE	0 <sup>1</sup>	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	---
	0,3	32,5 a	5,5 b	6 b	7,25 b	0 c	9 b	19,06
	0,6	47,5 a	36,25 a	10 c	35 b	10 c	15 c	11,63
	1,2	93,25 a	0 c	85,75 b	93,25 a	0 c	82,5 b	3,56
Fitotoxicidade 14 DAE	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	---
	0,3	20,75 a	12 ab	7,25 b	20,5 a	18,5 ab	25 a	32,78
	0,6	38,75 b	63,75 a	33,75 b	53,75 a	38,75 b	42,5 b	10,41
	1,2	93 a	90,5 ab	90,25 ab	92,5 ab	88,75 ab	86,5 b	2,97
Fitotoxicidade 21 DAE	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	---
	0,3	32,5 a	28,25 a	33,75 a	31,25 a	31,25 a	47,5 a	31,80
	0,6	58,75 ab	55 ab	58,75 ab	60 a	48,75 b	61,25 a	7,66
	1,2	93,5 ab	90,5 b	94,5 a	96,75 a	95,5 a	93,5 ab	1,69
Fitotoxicidade 28 DAE	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	---
	0,3	14 bc	19,5 bc	7,75 c	41,25 ab	13,75 bc	48,75 a	5,02
	0,6	7,25 e	33,75 d	58,75 bc	82 a	52,5 c	66,25 b	11,27
	1,2	10 c	93 b	95 ab	97,75 a	94 ab	94,5 ab	2,45

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Na avaliação da fitotoxicidade aos 21 DAE foi possível observar diferenças significativas entre a fitotoxicidade de plantas de pepino cultivadas em sucessão ao cornichão e nabo (51,25 e 56,25 %), em relação a fitotoxicidade de pepino cultivado em sucessão a aveia preta, ervilhaca, tremoço e a testemunha sem cultivo prévio (26, 25, 33, 75, 25 e 25 % respectivamente), quando submetidas ao dobro da dose recomendada de fomesafen (0,5 kg ha<sup>-1</sup>) (Tabela 1).

As plantas de pepino submetidas as doses de sulfentrazone avaliadas aos 21 DAE, não apresentaram diferenças significativas com relação a espécies cultivada anteriormente, mantendo-se níveis elevados de fitotoxicidade quando aplicada a dose de 1,2 kg ha<sup>-1</sup> (Tabela 1). De modo geral as plantas de pepino cultivadas em sucessão a aveia preta, ervilhaca, cornichão e tremoço, apresentaram baixos níveis de fitotoxicidade (19,5; 14,25; 11,25 e 13,5%), quando submetidas a dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen, aos 28 DAE. Enquanto que as plantas de pepino submetidas a dose de 1,2 kg ha<sup>-1</sup> do herbicida sulfentrazone o inverso foi observado. Aos 28 DAE é possível observar ainda que o pepino cultivado em sucessão a testemunha sem cultivo, apresenta níveis de 10% de fitotoxicidade, enquanto as demais plantas cultivadas em sucessão as espécies de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço apresentam fitotoxicidade acima dos 90%. A provável explicação talvez seja devido a influência das espécies sobre os microrganismos do solo, enquanto que a testemunha sem cultivo permaneceu sendo mantida sob as mesmas características e irrigada como as demais (Tabela 1).

Na dose comercial de sulfentrazone 0,6 kg ha<sup>-1</sup>, observou-se aos 28 DAE que o pepino cultivado em sucessão a aveia preta, apresentou os menores resultados quanto a fitotoxicidade (33,75%) em comparação as demais espécies. Diferentemente, para a dose comercial de fomesafen, 0,25 kg ha<sup>-1</sup>, aos 28 DAE onde as plantas de pepino cultivadas em sucessão a aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço, apresentaram níveis de fitotoxicidade abaixo de 10%, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 1).

Para as características de altura de plantas, área foliar e massa seca da parte aérea, a planta biodindicadora apresentou comportamento similar quando cultivada em sucessão a aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço (Figuras 3, 4 e 5). Quando submetidas as aplicações de fomesafen, as plantas de pepino não apresentaram resultados significativos quanto à altura de planta. Enquanto que submetidas ao herbicida sulfentrazone o pepino apresentou diminuição significativa na altura de plantas quando cultivadas em sucessão a

ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço (Figura 3B e Tabela 2). Resultados semelhantes foram observados por Santos et al. (2007) ao utilizarem o sorgo como planta bioindicadora, em sucessão a mucuna preta com aplicações de doses de trifloxysulfuron-sodium, sendo a planta bioindicadora afetada negativamente quanto a altura e a massa seca na presença do herbicida.

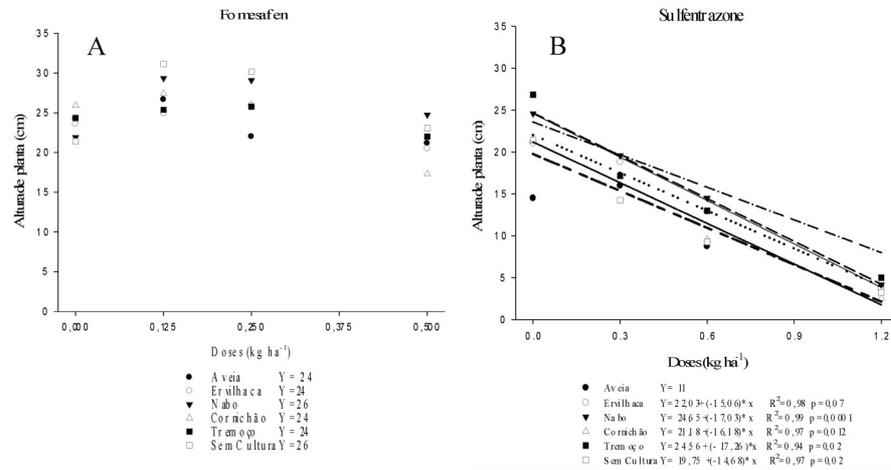


Figura 3. Altura das plantas de pepino (cm), em função do cultivo prévio de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão, tremoço e testemunha sem cultivo, após aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B).

Quando submetidas a dose recomendada de fomesafen ( $0,25 \text{ kg ha}^{-1}$ ), o pepino cultivado em sucessão a aveia preta apresentou a menor altura de planta, juntamente com o tremoço, ervilhaca e cornichão, diferindo estatisticamente das demais (Tabela 2). As plantas de pepino cultivadas em sucessão ao cornichão apresentaram as menores alturas de plantas, quando submetidas a dose de  $0,5 \text{ kg ha}^{-1}$  de fomesafen. A maior altura de plantas de pepino, no dobro da dose de fomesafen, ocorreu quando este foi cultivado em sucessão ao nabo. Já no cultivo em sucessão a testemunha sem cultivo, aveia preta, ervilhaca e tremoço, apresentaram altura intermediária, não diferiram estatisticamente entre si. As plantas de pepino cultivadas em sucessão a ervilhaca, nabo e tremoço não diferiram entre si, quando submetidas a dose recomendada do herbicida sulfentrazone ( $0,6 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Ainda na dose recomendada de sulfentrazone o pepino cultivado em sucessão a aveia preta, cornichão e testemunha sem cultivo prévio, não diferiram estatisticamente quanto a altura de planta (9,27; 8,75 e 9,55, respectivamente). Quando submetidas a dose de  $1,2 \text{ kg ha}^{-1}$  de sulfentrazone as plantas de

pepino cultivadas em sucessão a aveia preta, ervilhaca, nabo, tremoço e testemunha sem cultivo prévio, não apresentaram diferenças significativas entre si. Apenas as plantas de pepino cultivadas em sucessão ao tremoço apresentaram diferenças significativas na altura de planta em relação as demais espécies (5 cm) (Tabela 2).

Tabela 2. Altura de plantas de pepino (*Cucumis sativus*) cultivadas em sucessão as espécies com potencial fitorremediador (aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão, tremoço e testemunha sem cultivo), após aplicação de fomesafen e sulfentrazone.

Dose (kg ha <sup>-1</sup> ) Fomesafen	Test. Sem cultivo	Aveia preta	Ervilhaca	Nabo	Cornichão	Tremoço	C.V. %
0,0	21,42 b <sup>1</sup>	24,25 ab	23,58 ab	21,91 b	25,91a	24,33 ab	6,66
0,125	31,16 a	26,66 a	18,66 a	29,33 a	27,41 a	25,41 a	21,32
0,25	30,16 a	22 b	25,91 ab	29,08 a	26 ab	25,77 ab	10,36
0,5	23,08 ab	21,16 b	20,5 bc	24,75 a	17,33 c	22 ab	7,01
Dose (kg ha <sup>-1</sup> ) Sulfentrazone	Test. Sem cultivo	Aveia preta	Ervilhaca	Nabo	Cornichão	Tremoço	C.V. %
0,0	21,425 b	14,5 c	21,07 b	24,57 ab	21,6 b	26,82 a	8,78
0,3	14,25 b	16 ab	18,85 a	19,57 a	17,05 ab	17,2 ab	11,09
0,6	9,27 b	8,75 b	12,9 a	14,47 a	9,55 b	13 a	10,61
1,2	3,25 ab	3,9 ab	3,67 ab	4,15 ab	2,55 b	5,02 a	22,64

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

O pepino não apresentou redução significativa de sua área foliar com o incremento das doses de fomesafen (Figura 4A). A área foliar não apresentou diferenças significativas para a aveia preta, ervilhaca, cornichão e tremoço cultivadas com aplicação de fomesafen e as plantas sem aplicação (0 kg ha<sup>-1</sup>) (Tabela 3). O pepino apresentou redução significativa de sua área foliar em função do incremento das doses de sulfentrazone, quando cultivado em sucessão a ervilhaca, nabo e tremoço (Figura 4B).

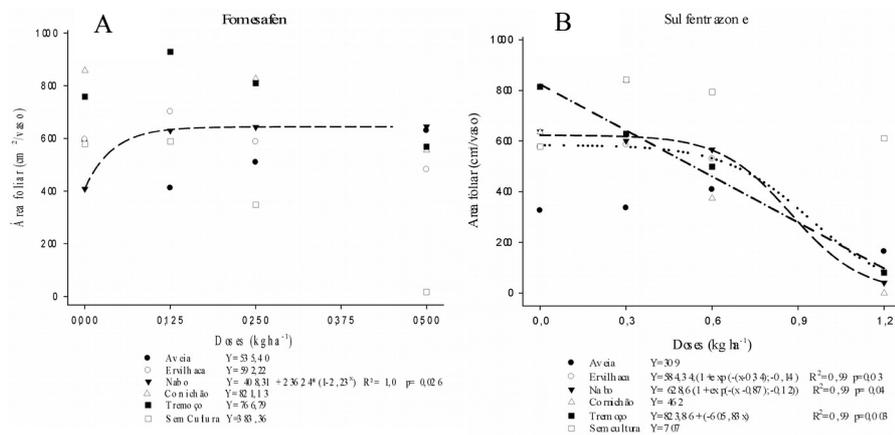


Figura 4. Área foliar (cm<sup>2</sup>/vaso) das plantas de pepino, em função do cultivo prévio de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão, tremoço e testemunha sem cultivo, após aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B).

Monquero et al. (2013) ao utilizarem milho e girassol como plantas bioindicadoras do diclosulam, semeadas em sucessão as espécies de *C. cajan*, *C. ensiformis*, *Mucuna cinerea* e *M. aterrima*, observaram menor área foliar nas plantas de girassol com o uso do herbicida. A espécie *M. cinerea* proporcionou menor área foliar do girassol na dose de 0,070 kg ha<sup>-1</sup> de diclosulam. Já a maior área foliar de girassol foi precedida pelo uso de *C. cajan* como fitorremediador.

A área foliar do pepino quando cultivado em sucessão a aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão, tremoço e testemunha sem cultivo não apresentaram diferenças significativas quando tratadas com fomesafen na dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup> (Tabela 3).

Por outro lado, quando submetidas a dose de 1,2 kg ha<sup>-1</sup> de sulfentrazone, as plantas de pepino cultivadas em sucessão a aveia preta, ervilhaca, nabo e tremoço não apresentaram diferenças significativas entre si. As menores áreas foliares foram observadas no pepino cultivado em sucessão ao cornichão e a testemunha sem cultivo, não apresentando diferenças significativas entre si (Tabela 03). Porém ocorreu elevada redução (acima de 90%) da área foliar do pepino com a aplicação do dobro da dose de sulfentrazone em relação as demais doses do herbicida.

Tabela 3. Área foliar (cm<sup>2</sup> por vaso) de plantas de pepino (*Cucumis sativus*) cultivadas em sucessão as espécies com potencial fitorremediador (aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão, tremoço e testemunha sem cultivo) após aplicação de fomesafen e sulfentrazone.

Dose (kg ha <sup>-1</sup> ) Fomesafen	Test. Sem cultivo	Aveia preta	Ervilhaca	Nabo	Cornichão	Tremoço	C.V. %
0,0	578,53 ab	590,15 ab	596,57 ab	408,31 b	857,89 a	758,60 a	21,19
0,125	842,97 ab	412,01 c	701,96 bc	629,64 bc	1044,67 a	929,38 ab	17,79
0,25	793,88 a	509,54 b	587,80 ab	643,22 ab	826,86 a	809,99 a	17,79
0,5	610,88 a	629,87 a	482,54 a	644,90 a	482,54 a	569,17 a	24,07
Dose (kg ha <sup>-1</sup> ) Sulfentrazone	Test. Sem cultivo	Aveia preta	Ervilhaca	Nabo	Cornichão	Tremoço	C.V. %
0,0	578,53 ab <sup>1</sup>	326,29 b	577,16 ab	638,02 ab	635,78 ab	814,35 a	24,43
0,3	589,54 b	336,41 c	585,63 b	600,66 b	839,68 a	629,05 ab	16,62
0,6	348,17 b	409,22 ab	530,20 ab	566,24 a	374,44 ab	498,98 ab	19,79
1,2	14,25 c	76,52 ab	63,79 ab	50,06 b	0c	91,3325 a	30,00

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

As plantas de pepino cultivadas em sucessão a aveia preta e/ou sem cultivo prévio, apresentaram redução significativa da massa seca da parte aérea com aplicação de fomesafen (Figura 5A). Ao se usar o sulfentrazone ocorreu redução significativa as plantas de pepino cultivadas em sucessão ao cornichão e ao tremoço (Figura 5B).

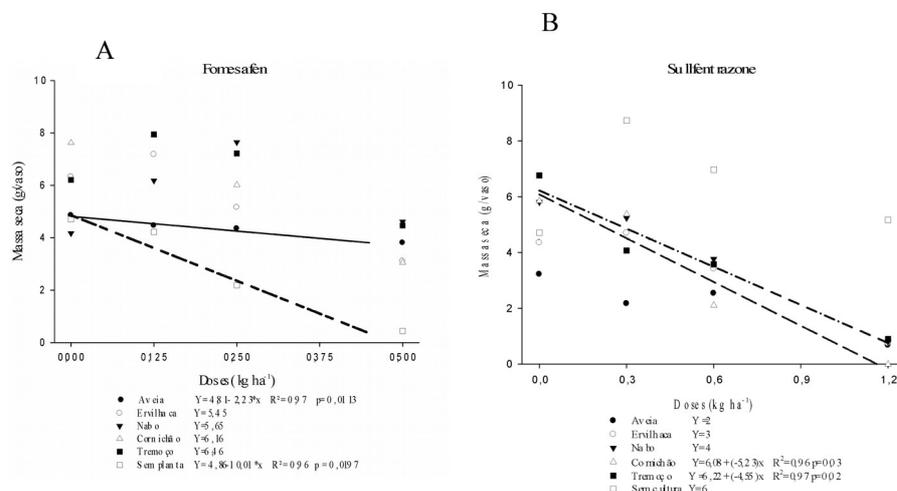


Figura 5. Massa seca (g/vaso) das plantas de pepino, em função do cultivo prévio de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão, tremoço e testemunha sem cultivo, após aplicação de doses de fomesafen (A) e sulfentrazone (B).

Resultados similares foram observados por Madalão et al. (2012), em que ocorreu aumento de biomassa, quando *C. juncea* foi cultivada anteriormente a *P. glaucum*, até a dose de 200 g ha<sup>-1</sup>. Pires et al. (2005) observaram que a aveia preta cultivada em sucessão a outras

espécies apresentou brusca redução da altura e da massa seca a partir da dose de 0,5 kg ha<sup>-1</sup>, não se desenvolvendo na dose de 1,5 kg ha<sup>-1</sup> de tebuthiuron.

O pepino apresentou diferenças significativas na massa seca com a aplicação de 0,5 kg ha<sup>-1</sup> de fomesafen, quando cultivado em sucessão a todas as espécies testadas e a testemunha sem cultivo. As plantas de pepino submetidas a dose de 1,2 kg ha<sup>-1</sup> de sulfentrazone não apresentaram diferenças significativas quando cultivadas em sucessão a aveia preta, ervilhaca, nabo e tremoço (Tabela 4). Porém, nesta dose, houve elevada redução da massa seca do pepino, acima de 80% quando comparada com a dose zero.

Tabela 4. Massa seca de plantas de pepino (*Cucumis sativus*) cultivadas em sucessão as espécies com potencial fitorremediador (aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão, tremoço e testemunha sem cultivo), após aplicação de fomesafen e sulfentrazone.

Dose (kg ha <sup>-1</sup> ) Fomesafen	Test. Sem cultivo	Aveia preta	Ervilhaca	Nabo	Cornichão	Tremoço	C.V. %
0	4,7075 b <sup>1</sup>	4,86 b	6,33 ab	4,17 b	7,625 a	6,20 ab	20,00
0,125	8,725 a	4,47 c	7,18 ab	6,18 bc	7,92 ab	7,94 ab	11,90
0,25	6,96 ab	4,35 c	5,16 bc	7,64 a	6,02 abc	7,21 ab	15,95
0,5	5,16 a	3,81 ab	3,11 b	4,61 ab	3,05 b	4,47 ab	19,62
Dose (kg ha <sup>-1</sup> ) Sulfentrazone	Test. Sem cultivo	Aveia preta	Ervilhaca	Nabo	Cornichão	Tremoço	C.V. (%)
0,0	4,70 abc	3,22 c	4,35 bc	5,80 ab	5,84 ab	6,76 a	18,94
0,3	4,22 a	2,17 b	4,70 a	5,24 a	5,36 a	4,07 a	13,16
0,6	2,18 bc	2,53 abc	3,41 ab	3,76 a	2,11 c	3,58 a	18,75
1,2	0,44 ab	0,675 a	0,74 a	0,79 a	0 b	0,9 a	38,78

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

## CONCLUSÕES

1. Ocorreu efeito negativo das doses de fomesafen e sulfentrazone sobre a fitotoxicidade, altura, área foliar e massa seca da parte aérea das plantas de pepino, quando em sucessão às diferentes espécies fitorremediadoras e às testemunhas sem cultivo prévio.
2. A fitotoxicidade ao pepino aumentou, para todas as espécies potencialmente fitorremediadoras avaliadas, com o incremento nas doses de fomesafen e sulfentrazone.
3. A ervilhaca, o cornichão e o tremoço foram as espécies que apresentaram a maior capacidade de fitorremediar solos contaminados com fomesafen, até o dobro da dose recomendada (0,5 kg ha<sup>-1</sup>).

4. Todas as espécies testadas não conseguiram fitorremediar o solo tratado com sulfentrazone, já que o pepino apresentou alta fitotoxicidade quando cultivado após as coberturas de inverno.

## REFERÊNCIAS

- ALI, H. et al. Phytoremediation of heavy metals concepts and applications. *Chemosphere*, v.91, n.7, p.869-881, 2013.
- BRAGA, R. R. et al. Effect of growing *Brachiria brizantha* on phytoremediation of picloram under different pH environments. *Ecological Engineering*, v.94, n.1, p.102-106, 2016.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária de Solos (Brasília, DF). Sistema brasileiro de classificação de solos. Embrapa Produção de Informação; Brasília, DF: Embrapa Solos, 2013. 154 p.
- HULTING, A. G. et al. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars tolerance to sulfentrazone. *Crop Protection*, v.20, n.8, p.679-683, 2001.
- LAVORENTI, A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B. Comportamento de pesticidas em solos: fundamentos. In: Curi, N. et al. Tópicos especiais em ciência do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003, p.335- 400.
- MADALÃO, J. C. et al. Susceptibilidade de espécies de plantas com potencial de fitorremediação do herbicida sulfentrazone. *Revista Ceres*, v.60, n.1, p.111-121, 2013.
- MADALÃO, J. C. et al. Uso de leguminosas na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 42, n. 4, p. 390-396, 2012.
- MONQUERO, P.A. et al. Seleção de espécies de adubos verdes visando à fitorremediação de diclosulam. *Planta Daninha*, v.31, n.1, p.127-135, 2013.
- MOOSAVI, S. G.; SEGHATOLESLAMI, M. J. Phytoremediation: A Review. *Advance in Agriculture and Biology*, v.1, n.1, p.5-11, 2013.
- NUNES, A. L.; VIDAL, R. A. Seleção de plantas quantificadoras de herbicidas residuais.

*Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente*, v.19, n.1, p.19-28, 2009.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.S. et al. Influência do período de restrição hídrica na atividade residual de isoxaflutole no solo. *Planta Daninha*, v 24, n.4, p.733-740, 2006.

PIRES, F.R. et al. Fitorremediação de solos contaminados com tebuthiuron utilizando-se espécies cultivadas para adubação verde. *Planta Daninha*, v.23, n.4, p.711-717, 2005.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. Guia de herbicidas. 6.ed. Londrina: Grafmarke, 2011. 697 p.

SANTOS, E. A. et al. Fitoestimulação por *Stizolobium aterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfuron sodium. *Planta Daninha*, v.25, n.2, p. 259-265, 2007.

SBCPD - Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas. Londrina: 1995. 42 p.

VIVIAN, R. et al. Persistência de sulfentrazone em Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. *Planta Daninha*, v.24, n.4, p.741-750, 2006.

**Artigo 5**

**EFFECT OF HERBICIDES IN THE OXIDATIVE STRESS IN CROP  
WINTER SPECIES**

**O artigo apresenta-se escrito sob as normas da revista Archives of Environmental  
Contamination and Toxicology e posteriormente será submetido à mesma.**

## **EFFECT OF HERBICIDES IN THE OXIDATIVE STRESS IN CROP WINTER SPECIES**

<sup>1,2</sup>Carla Alves, <sup>2</sup>Eduarda Costa, <sup>2</sup>Jessica Reis Sofiatti, <sup>1</sup>Cesar Tiago Forte, <sup>1</sup>Fábio Luis Winter,  
<sup>1</sup>Cinthia Maetê Holz, <sup>1,2,\*</sup>Rosilene Rodrigues Kaizer, <sup>1</sup>Leandro Galon

<sup>1</sup>Federal University of Fronteira Sul, Post Graduate Program in Environmental Science and Technology, Erechim, Brazil; <sup>2</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Sul, Sertão, Brazil.

\*Corresponding author [rosikaizer@gmail.com](mailto:rosikaizer@gmail.com)

## ABSTRACT

Most herbicides applied in crop field, stay in the soil for a period, affecting next crop or even the plants using as green manure. Nowadays, when the use of herbicides grow to increase productivity, mainly in the grain producing region north of Rio Grande do Sul state. The objective of this study was to evaluate the effects of herbicides fomesafen and sulfentrazone on antioxidant system in *Avena sativa*, *Vicia sativa*, *Raphanus sativus* and *Lupinus albus*. The plants were exposed to varying concentrations of fomesafen (0, 0.125, 0.25 and 0.5 kg ha<sup>-1</sup>) and sulfentrazone (0, 0.3, 0.6 and 1.2 kg ha<sup>-1</sup>). For this, the activities of, ascorbat peroxidase, catalase and guaiacol enzymes were analyzed, and the levels of lipid peroxidation were quantificated. Fomesafen and sulfentrazone promoted alterations in balance of plants generating oxidative stress and elicit the response of the antioxidant system of plants, mainly in the high doses of fomesafen, for the species *V. sativa* and *R. sativus*. At same time, the 1,2 kg ha<sup>-1</sup> dose of sulfentrazone generate lipid peroxidation for *V. sativa*, *R. sativus* and *L. albus*. Additionally, *A. sativa* was the specie that demonstrated low alterations on antioxidant system with the exposure to herbicide fomesafen and sulfentrazone. In this way, we can suggest that the species present a better response in defense of the oxidative stress generated by the herbicides.

Keywords: Catalase, Enzymes, Agricultural plants, PROTOX system

## HIGHLIGHTS

Fomesafen and sulfentrazone cause different reactions on antioxidant system in *A. sativa*, *V. sativa*, *R. sativus* and *L. albus*.

*V. sativa*, *R. sativus* and *L. albus* were negative affected by sulfentrazone in the dose 1.2 kg ha<sup>-1</sup>, showing an increased on levels of lipid peroxidation.

*A. sativa* demonstrated fewer alterations on antioxidant system on both herbicides exposure.

## **Introduction**

Brazil has recently the largest consumer market of agrochemicals worldwide, and herbicides represent 69% of the total consumption of such chemicals (SINDIVEG 2016). In crops field, many herbicides are used to control weed, however these toxicants can remain in the soil for long periods and can contaminate rivers and subterranean waters. Thus, these chemicals can promote several ecotoxicological and environmental effects, as elicit alterations on antioxidant system in non-target organisms, as sensitive plants.

Some herbicides like fomesafen and sulfentrazone are inhibitors of protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) system. Mechanism of action of PROTOX inhibitors herbicides is involved in the inhibition of the protoporphyrinogen oxidase enzyme, which acts on the oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin IX (precursor of chlorophyll) and heme clusters. Enzyme PROTOX inhibition promote accumulation of protoporphyrinogen in chloroplast, so it diffuses into the cytoplasm and then form protoporphyrin IX. In the cytoplasm and in the presence of light the protoporphyrin IX interacts with oxygen generating an oxygen singlet. This  $O_2$  in the singlet state is responsible for peroxidation of lipids in cell membranes. As a cascade effect, free radicals are formed resulting in the degradation of lipids and proteins, leading to loss of chlorophyll, carotenoids and disruption of cell membranes (Mateus et al. 2004, Oliveira et al. 2002). Various abiotic stresses lead to the overproduction of Reactive Oxygen Species (ROS) in plants, which are reactive and toxic causing damage to proteins, lipids, carbohydrates and DNA, which ultimately results in oxidative stress (Gill and Tuteja 2010). This mechanism disrupts the physiology of plant and causes loss in the plants weight, photosynthesis and productivity. One of these alterations can promote the oxidative stress in green manures under residual herbicide in the soil.

Level of stress in a cell is determined by the ratio between the status of antioxidant defense and the amount of ROS, present in the forms of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems in plants are presents in various cell compartments. Among the main enzymatic antioxidant defenses, are superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and catalases (CAT), which promote the control of ROS levels. Thus, knowing the role of SOD, APX, CAT and GPX define the status of the antioxidant system, which is very important in the reduction of the levels of ROS in the cells (Apel and Hirt 2004; Cavalcanti et al. 2004), avoiding the oxidative stress promotion.

Herbicides can be considered as an environmental factor to elicit the oxidative stress, through the inhibition of antioxidant defense or by enhanced of ROS levels. Actually, associated to the use of herbicides the technique of green manure promotes the improvement

of physical and chemical properties in soil. They have great inhibitory power over weeds, even after cutting and forming a mulch on the soil. The mulch protects the soil from solar radiation, dissipates the energy of rainfall impact, reduces water evaporation, and increases the cycling of nutrients, as well as being an alternative to control of weeds, reducing the use of herbicides (Mateus et al. 2004).

Thus, it's necessary to know how herbicides affect the plants used as green manure, since they will contact with residues of herbicides in the soil, derived from the predecessor crop. Considering common winter species used in crop fields on Rio Grande do Sul, *A. sativa*, *V. sativa*, *R. sativus* and *L. albus* acts as green manures and improve the soil properties. Thus, the objective of this study was to evaluate if the herbicides fomesafen and sulfentrazone, caused oxidative stress to *Avena sativa*, *Vicia sativa*, *Raphanus sativus* and *Lupinus albus*.

## **Material and Methods**

### **Plant material and growth conditions**

Experiments were conducted under greenhouse conditions in Federal University of the Fronteira Sul (UFFS), Erechim, RS, Brazil. The treatments were composed of a combination of *Avena sativa*, *Vicia sativa*, *Raphannus sativus*, and *Lupinus albus*, and different concentrations of fomesafen (0.0, 0.125, 0.25, 0.5 kg ha<sup>-1</sup>), or sulfentrazone (0.0, 0.3, 0.6 and 1.2 kg ha<sup>-1</sup>), applied in pre-emergence of cultures. These doses are half, the dose and double dose that has used in fields. Treatments were arranged with complete randomized blocks with four replications. All determinations were performed in three replicates.

After the filling polyethylene pot (8 dm<sup>3</sup>) with alum-ferric humic Red Latosol (EMBRAPA 2013) from the herbicide free area. Soil fertility correction performed based on the chemical analysis of the soil and according to the technical recommendations for the cultures involved in the trials (ROLAS 2004). After one-day herbicides fomesafen and sulfentrazone were applied using a precision cost sprayer, equipped with two spray tips of the TT 110.02 series, which sprayed a volume of 150 L ha<sup>-1</sup>. Irrigation controlled daily in the experimental units, maintaining humidity around 80% of field capacity.

### **Tissue preparation**

After harvest plants shoots were freezing in liquid nitrogen. Then the shoots were macerated with liquid nitrogen, and used to all analysis. The exceeding material was stocked in ultra-freezer – 80°C.

## **Antioxidant enzyme activities assays**

### **Catalase (CAT)**

For the CAT assay, the homogenization of shoots tissue material in a solution containing 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.0), 10 g  $\text{L}^{-1}$  PVP, 0.2 mM EDTA and 10 mL  $\text{L}^{-1}$  X-100. Then the homogenate was centrifuged at 12000  $\times g$  at 4 °C for 20 min. Supernatant was used to determine catalase activity, which was assayed according to the modified method of (Aebi 1984) by monitoring the disappearance of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by measuring the decrease in absorbance at 240 nm. In a reaction mixture with a final volume of 2 mL containing 15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.0) and 30  $\mu\text{L}$  extract. Catalase activity was expressed as percentage (%) of difference between control without herbicide.

### **Guaiacol peroxidase (GPX)**

Guaiacol peroxidase activity was determined using guaiacol as substrate (Zeraik 2008). The reaction mixture contained 1.0 mL of potassium phosphate buffer (100 mM, pH 6.5), 1.0 ml guaiacol (15 mM) and 1.0 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mM). After homogenization, 50  $\mu\text{L}$  of the plant extract was added to this solution. The activity of the enzyme was measured by oxidation of guaiacol to tetraguaiacol by increasing the absorbance at 470 nm. The results were expressed as percentage (%) of difference between control without herbicide.

### **Ascorbate peroxidase (APX)**

For determination of APX activity, plants extract were homogenized in a 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.0) containing 1 mM EDTA and 2% PVP, pH 7.8, at a ratio of 1:3 (w/v). Then the homogenate was centrifuged at 13000  $\times g$  for 20 min at 4°C, and the supernatant was used for enzyme activity. Enzyme activity was assayed according to the modified method of Zhu (2002). The reaction mixture, at a total volume of 2 mL, consisted of 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 0.25 mM ascorbate, 1.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 100  $\mu\text{L}$  extract.  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependent oxidation of ascorbate was followed by a decrease in absorbance at 290 nm ( $E_{290} \approx 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Ascorbate peroxidase activity was expressed as mmol oxidized ascorbate/min/mg protein.

### **Estimation of lipid peroxidation**

Levels of lipid peroxidation in the plants were determined by measuring malondialdehyde (MDA) content from the thiobarbituric acid (TBA) (EL-Moshaty et al. 1993). The shoots were homogenized in 0.2M citrate–phosphate buffer, pH 6.5. The

homogenate was filtered through two layers of paper filter and then centrifuged at 20000 g at 4°C for 15 min. One milliliter of the supernatant fraction was added to an equal volume of 20% TCA containing 0.5% TBA. Tubes were placed in a 95°C water bath for 40 min, and then immediately cooled on ice for 15 min. Samples were centrifuged at 10000g for 15 min. The absorbance of the supernatant at 532 nm was read and corrected for unspecific turbidity by subtracting the value at 600 nm. MDA values expressed in nmol MDA/mg protein.

### Statistical analysis

The data was shown with means  $\pm$  SD, and analyzed with one way ANOVA. The mean differences compared utilizing Tukey's range test with Graph Pad Prism®,  $p < 0.05$ .

## Results

### Catalase

Fomesafen causes a decrease in CAT activity in *V. sativa*, *R. sativus* and *L. albus*. CAT activities in *V. sativa* decrease 79% in 0.5 kg ha<sup>-1</sup>, in comparison to the control (0 kg ha<sup>-1</sup>). *R. sativus* and *L. albus* don't show significant differences in relation to the control, and the first, in the higher dose of fomesafen occurs the plant death (Fig. 1). For fomesafen *R. sativus* don't survive when applied the 0.5 kg ha<sup>-1</sup>. On other hand, after the fomesafen exposure the CAT activity increased 213% in the dose of 0.5 kg ha<sup>-1</sup> for *A. sativa*, when compared to the control group.

Sulfentrazone exposure promotes an increased in CAT activity for both *R. sativus* and *L. albus*. Interesting result was observed in *R. sativus* that shows significant increase CAT activity 1000% (1.2 kg ha<sup>-1</sup>) difference in comparison with the control (Fig. 2). Moreover, CAT activity increased in the dose of 0,6 kg ha<sup>-1</sup> for *A. sativa* and *L. albus*, as a result of sulfentrazone exposure (19 and 386%) , when compared to the control group (0 kg ha<sup>-1</sup>), respectively. However, in the dose of 1.2 kg ha<sup>-1</sup>, the activity decreased considerably for *A. sativa* (79%) and *V. sativa* (49%), both in comparison to the control group.

### Guaiacol (GPX)

*A. sativa* show drastic reduction on Guaiacol peroxidase activity, on the three doses of fomesafen applied. However, *V. sativa* show an increased in the GPX activity in 0.250 and 0.5 kg ha<sup>-1</sup>. To *L. albus* in the dose of 0.125 and 0.5kg ha<sup>-1</sup> had a decrease in activity to (35%) and (33%), when compared to control group (Fig. 3), respectively.

*R. sativus* has an impressive increase on GPX activity on the dose of 0.250 kg ha<sup>-1</sup>, about 3000% in relation to the control group. Herbicide sulfentrazone cause a decreased on GPX activity for *A. sativa* (37%), *R. sativus* (89%) and *L. albus* (95%) in 0.250 and 0.5 kg ha<sup>-1</sup>, though the *V. sativa* shows no difference between the control and the treatments (Fig. 4).

### **Lipid peroxidation**

Lipid peroxidation expressed in terms of MDA formed in shoot tissues of the species exposed to both herbicides, show different results for each plants. In *V. sativa* clearly was observed that the levels of lipid peroxidation increased significantly in according to the enhancement of the fomesafen concentration, when compared to the control group. On the other hand, *A. sativa*, *R. sativus* and *L. albus*, shows a significance decrease in the lipid peroxidation with increasing the concentration of fomesafen, (62, 100 and 12,5%) comparing with the 0 kg ha<sup>-1</sup> treatment (Fig. 5). Lipid peroxidation promoted by sulfentrazone, just *A. sativa* shows a significance decrease in the level of MDA (16%). *R. sativus* and *L. albus* have an increase in the levels of MDA in the concentration of 1.2 kg ha<sup>-1</sup> of sulfentrazone (60 and 57,8%), in comparison with the control group (Fig. 6).

### **Ascorbate peroxidase**

The presence of fomesafen in the soil caused and increase in APX activity only in *V. sativa* (0.5 kg ha<sup>-1</sup>). *R. sativus* showed a decreased in APX activity only on 0.25 kg ha<sup>-1</sup> herbicide concentration. On the other hand, *L. albus* and *A. sativa* showed a decreased in the activity of APX (0.5 kg ha<sup>-1</sup>).

At same time, sulfentrazone exposure at 0.6 kg ha<sup>-1</sup> decreased APX activity in *A. sativa*, and *L. albus* in 0.6 and 1.2 kg ha<sup>-1</sup>. However, *R. sativus* presented an increased on enzyme activity (0.6 kg ha<sup>-1</sup>). Although, *V. sativa* don't show significative difference between control in all concentrations of sulfentrazone.

### **Discussion**

This study revealed the effect of herbicide exposure in the promotion of oxidative stress and response of antioxidant defense mechanism in species used as green manure. It is clear fomesafen and sulfentrazone toxicity depends not only on the concentration, but also on specie used.

Among the main enzymes of plants, antioxidant defense mechanism the most important is Catalase. CAT enzyme are tetrameric heme containing enzymes with the

potential directly dismutate  $\text{H}_2\text{O}_2$  into  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$ , indispensable for ROS detoxification during stressed condition (Garg and Manchanda 2009). CAT has one of the highest turnover rates for all enzymes: one molecule of CAT can convert 6 million molecules of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$  per minute. CAT is important in the removal of  $\text{H}_2\text{O}_2$  generated in peroxisomes by oxidases involved in  $\beta$ -oxidation of fatty acids, photorespiration and purine (Agostinetto et al. 2016). After fomesafen exposure, outcomes show a decrease in the CAT enzyme activity, which directly related to the increase in the lipid peroxidation. In this scenario, *V. sativa* shows and uptake in the lipid peroxidation, that can be because the loss in the antioxidant system, due the stress caused by fomesafen. Actually, sulfentrazone was not able to cause the lipid peroxidation, considering the specie *V. sativa* that showed an increased in the CAT activity and in the levels of MDA. Moreover, after exposure fomesafen CAT activity increased 213% in the dose of  $0.5 \text{ kg ha}^{-1}$  for *A. sativa*.

Generally, dysfunction on the antioxidant system results in establishment the oxidative stress, which could be progresses to lipid peroxidation. In fact, MDA considered a good marker for the structural integrity of membranes, for indicating the level of damage to lipids by oxidation reactions (Ekmekci and Terziog 2005). For plants who has the rises dry weight, in previous results, (data not show), *A. sativa*, *R. sativus* and *L. albus* show the lower levels of lipid peroxidation when submitted to fomesafen high doses. One other hand, for sulfentrazone just *A. sativa* decreased the levels of MDA. Several studies demonstrated the effects of herbicides bentazon, clodinafop, iodosulfuron, metribuzin, metsulfuron and 2,4-D under *R. sativus* show an increase in CAT activity, when 2,4-D was applied. Lipid peroxidation shows no difference between herbicides. MDA accumulation in absolute values was observed in the treatments with metsulfuron and 2,4-D (Agostinetto et al. 2016).

Results demonstrate antioxidant defense system was negatively affected by fomesafen and sulfentrazone leading to lipid peroxidation. *A. sativa* demonstrated less affected by these herbicides. Increasing fomesafen and sulfentrazone concentration induced increase in reactive oxygen species levels in the plant. Increased production of reactive oxygen species, especially under higher fomesafen and sulfentrazone concentrations ( $\geq 0.25 \text{ kg ha}^{-1}$  and  $0.6 \text{ kg ha}^{-1}$ ) could weaken the antioxidant defense system.

Sulfentrazone was responsible for an increase in GPX activity in *A. sativa* on  $0.3 \text{ kg ha}^{-1}$ . The same occur in wheat treated with thiourea increased the leaf GPX and CAT activities as a preventive effect on proteins. Thiourea were able to enhance the antioxidant system under oxidative stress by hydrogen peroxide (Hameed et al. 2013). This result is very promisor considering the *A. sativa* is most commonly used as a green manure, so the CAT activity

increased the plant defense against residual herbicides. Even so, sulfentrazone cause a decrease in GPX activity in all concentrations applied in *L. albus*.

In corroboration, some studies showed that herbicides exposure was accompanied by the significant enhancing both CAT and GPX activities in maize roots and leaves. It well known that the presence of a few enzymes with the same catalytic function expands the plant organism adaptable possibilities, which are very important to sustain the vital functions under stress. So maize plants adaptation to soil herbicides was associated with the induction of catalase and peroxidase pathway of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging (Kordyum et al. 2005; Grigoryuk et al. 2016).

In association, APX enzyme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging in plants converts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O using ascorbate as an electron donor (Pereira 2011). In this study, was demonstrated a decrease of APX in 0,6 kg ha<sup>-1</sup> of sulfentrazone in all green manure species evaluated. Thus, taken together the results we can suggest that the herbicides affect negatively the green manure species evaluated in this study, as *V. sativa*, *R. sativus* and *L. albus*. In fact, *A. sativa* as demonstrated a most efficient mechanism of defense against the herbicides fomesafen and sulfentrazone, through of strategy to elicit of antioxidant enzymatic defense.

## Summary

Taken together, the outcomes can suggest that both herbicides promoted alterations on plant homeostasis eliciting the response of the antioxidant system of plants, mainly in the high doses of fomesafen, for the species *V. sativa* and *R. sativus*. At same time, at 1.2 kg ha<sup>-1</sup> dose of sulfentrazone had inhibition of antioxidant enzymes for *V. sativa*, *R. sativus* and *L. albus*. Thus, we can suggest that this herbicide, sulfentrazone, generates oxidative stress. Additionally, *A. sativa* was the specie that demonstrated low alterations on antioxidant system with the exposure to herbicide fomesafen and sulfentrazone. Thus, we can suggest that the *A. sativa* is the preference specie used as green manure after the herbicides application.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for the financial support. So gratefull to Luciane Tabaldi, for helping and contribution.

## References

Aebi, H. (1984) Methods Enzymol. 105:121–126.

- Agostinetto, D, Perboni, LT, Langaro, AC, Gomes, J, Fraga, DS, Franco, JJ (2016) Changes in photosynthesis and oxidative stress in wheat plants submitted to herbicides application. *Planta Daninha* 34:1-9
- Apel, K, Hirt, H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann Rev Plant Biol* 55:373-99
- Cavalcanti, FR, Oliveira, JTA, Martins-Miranda, AS, Viégas, RA, Silveira, JAG (2004) Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phyt* 163:563–57
- Ekmekci, Y, Terzioglu, S (2005) Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. *Pestic Biochem Physiol* 83(2):69-81
- El-Moshaty, FIB, Pike, SM, Novacky, AJ, Sehgal, OP (1993) Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Phys and Molec Plant Path* 43:109-119
- Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária de Solos (Brasília, DF). Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa Produção de Informação; Brasília, DF: Embrapa Solos, 2013. 154 p.
- Garg, N, Manchanda, G (2009) ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosys* 143:8-96
- Gill, SS, Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Phys and Bioch* 48:909-930
- Grigoryuk, IP, Lykholat, UV, Rossykhina-Galycha, GS, Khromykh, NO, Serga, OI. (2016) Effect of soil herbicides on the antioxidant system of maize vegetative organs during ontogenesis. *Ann Agrarian Sci* 46:95-98
- Hameed, A, Jafri L, Sheikh MA. (2013) Effect of thiourea on proteins, catalase, guaiacol-peroxidase and protease activities in wheat leaves under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress. *Iranian Journ of Plant Phys* 4(1):857-864
- Kordyum, EL, Sytnik, RM, Baranenko, VV. *Cells Mechanisms of Plant Adaptation to the Adverse Environmental factors at Natural Conditions*, 2005, p. 278.
- Mateus, GP, Crusciol, CAC, Negrisoni, E. (2004) Palhada do sorgo de guiné gigante no estabelecimento de plantas daninhas em área de plantio direto. *Pesq. Agropec. Bras* 39(6):539-542
- Oliveira, TK, Carvalho, GJ, Moraes, RNS. (2002) Plantas de cobertura e seus efeitos sobre o feijoeiro em plantio direto. *Pesq Agrop Bras* 37(8):1079-1087
- Rede Oficial De Laboratórios De Análise De Solo E De Tecido Vegetal (ROLAS). Manual de adubação e calagem parágrafo OS Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina . 10. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004.
- Sindicato Nacional Da Indústria De Produtos Para Defesa Vegetal – SINDIVEG: 2016 Importações de defensivos agrícolas têm aumento no primeiro semestre de 2016.

Figures

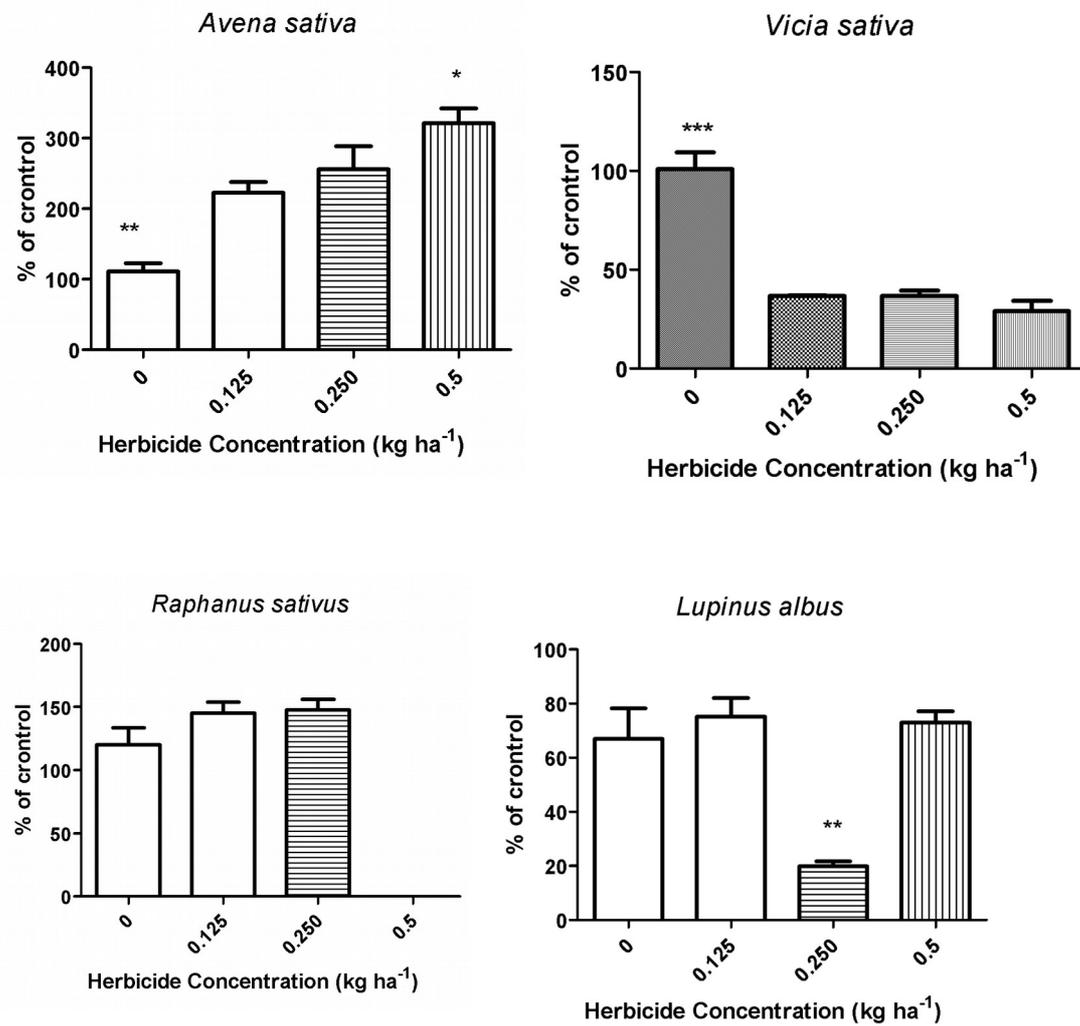


Fig. 1. Effect of fomesafen on catalase (CAT) activity in different plants. Data represent the mean  $\pm$  SD of three different experiments. Different from control at  $p < 0.05$ .

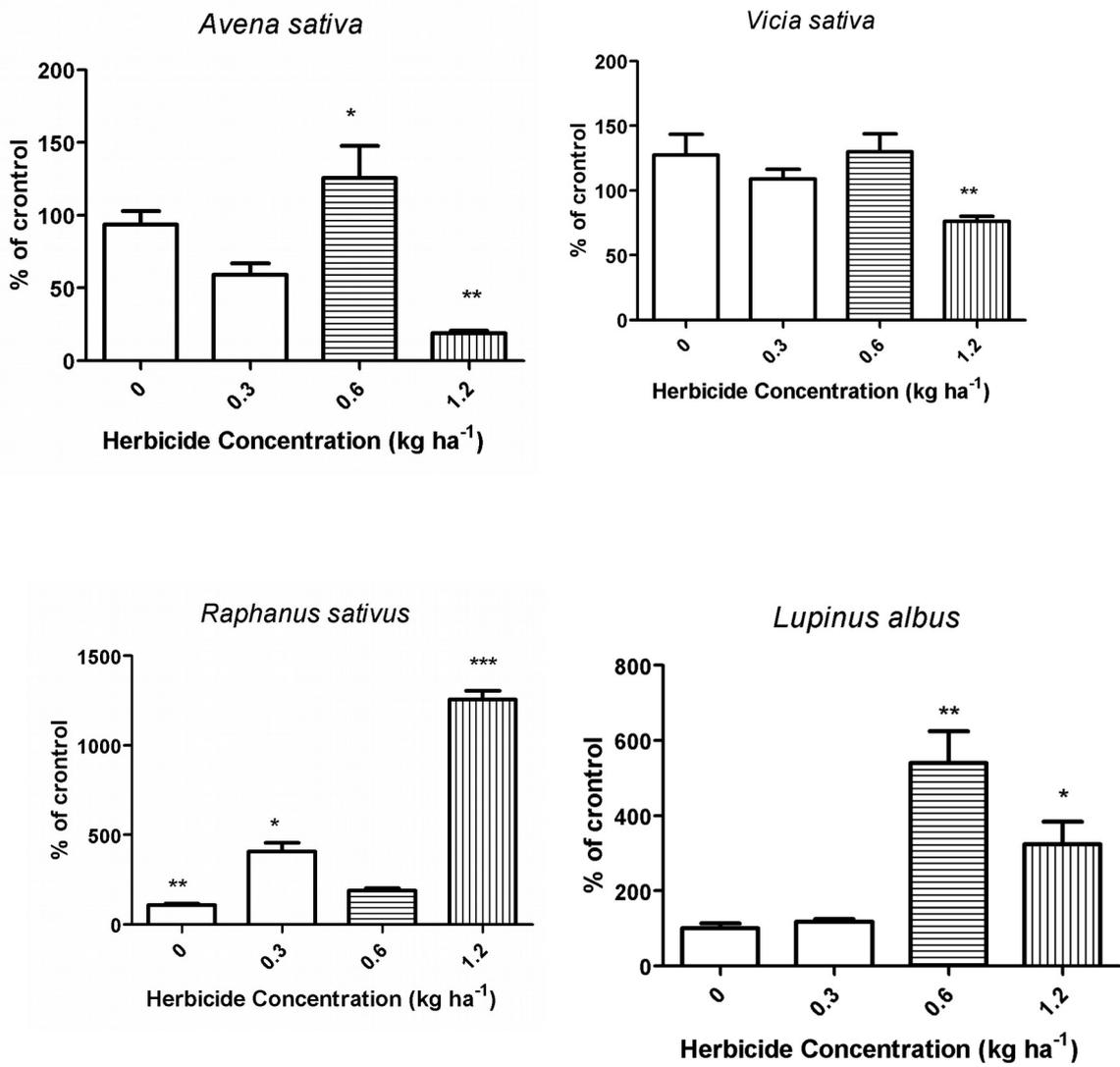


Fig. 2. Effect of sulfentrazone on catalase (CAT) activity in different plants. Data represent the mean  $\pm$  SD of three different experiments. Different from control at  $p < 0.05$ .

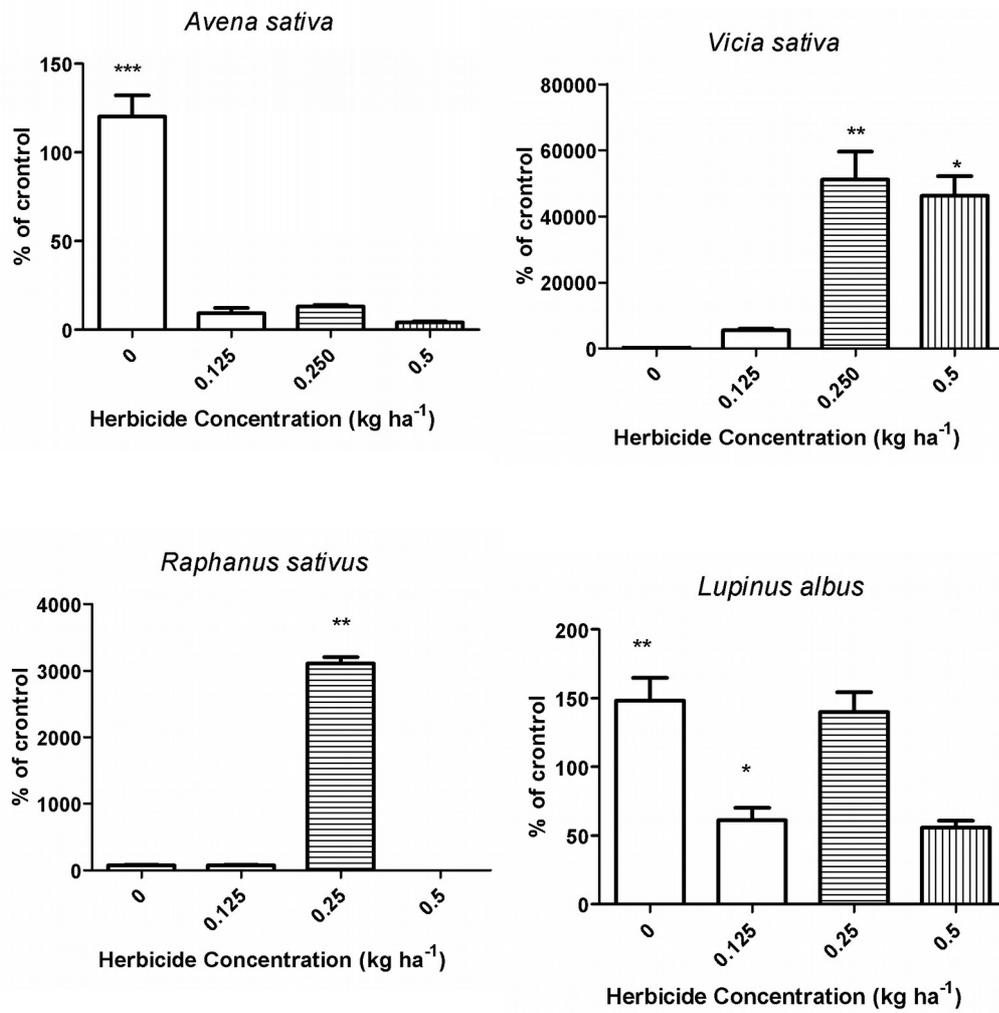


Fig 3. Effect of fomesafen on guaiacol peroxidase (GPX) in different species. Data represent the mean  $\pm$  SD of three different experiments. Different from control at  $p > 0.05$ .

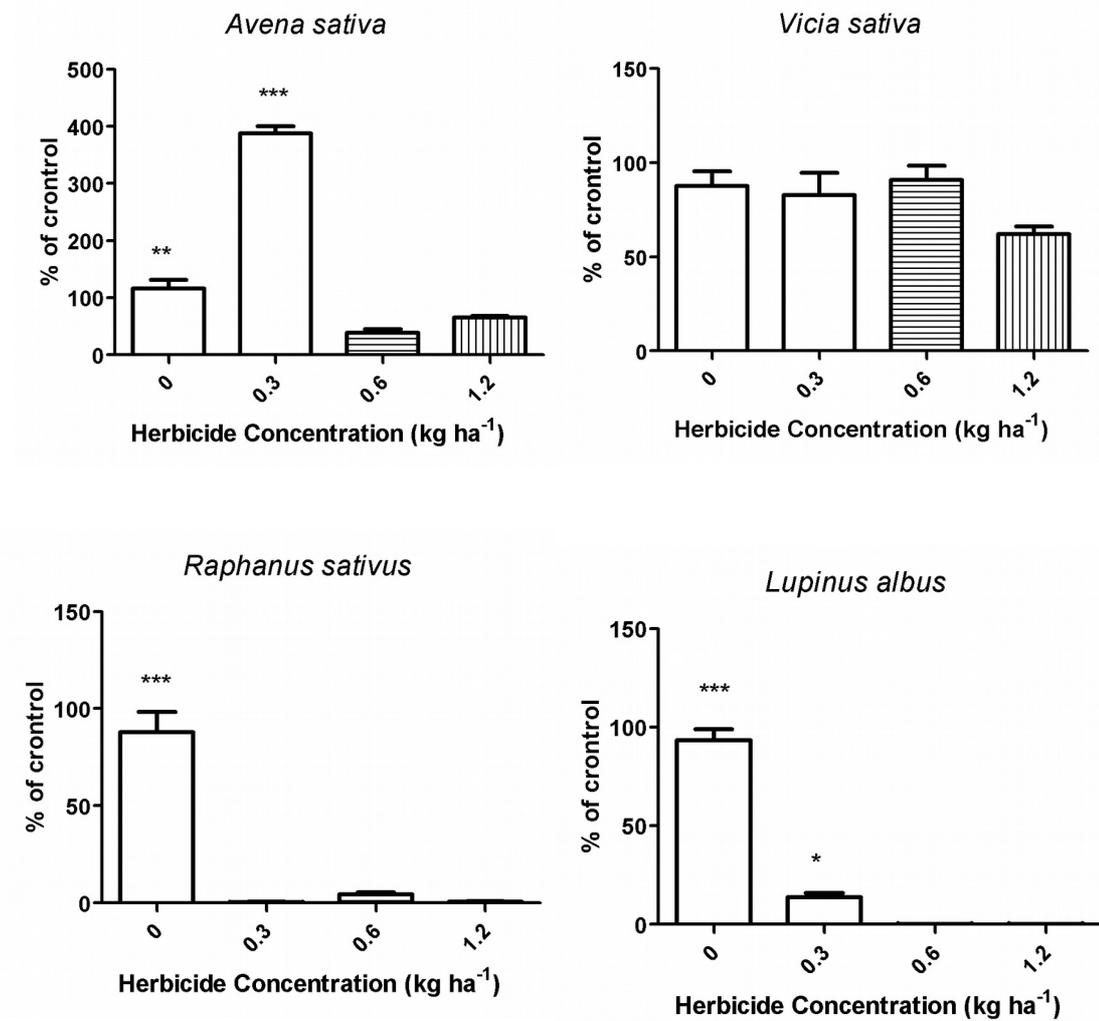


Fig 4. Effect of sulfentrazone on guaiacol peroxidase (GPX) in different species. Data represent the mean  $\pm$  SD of three different experiments. Different from control at  $p < 0.05$ .

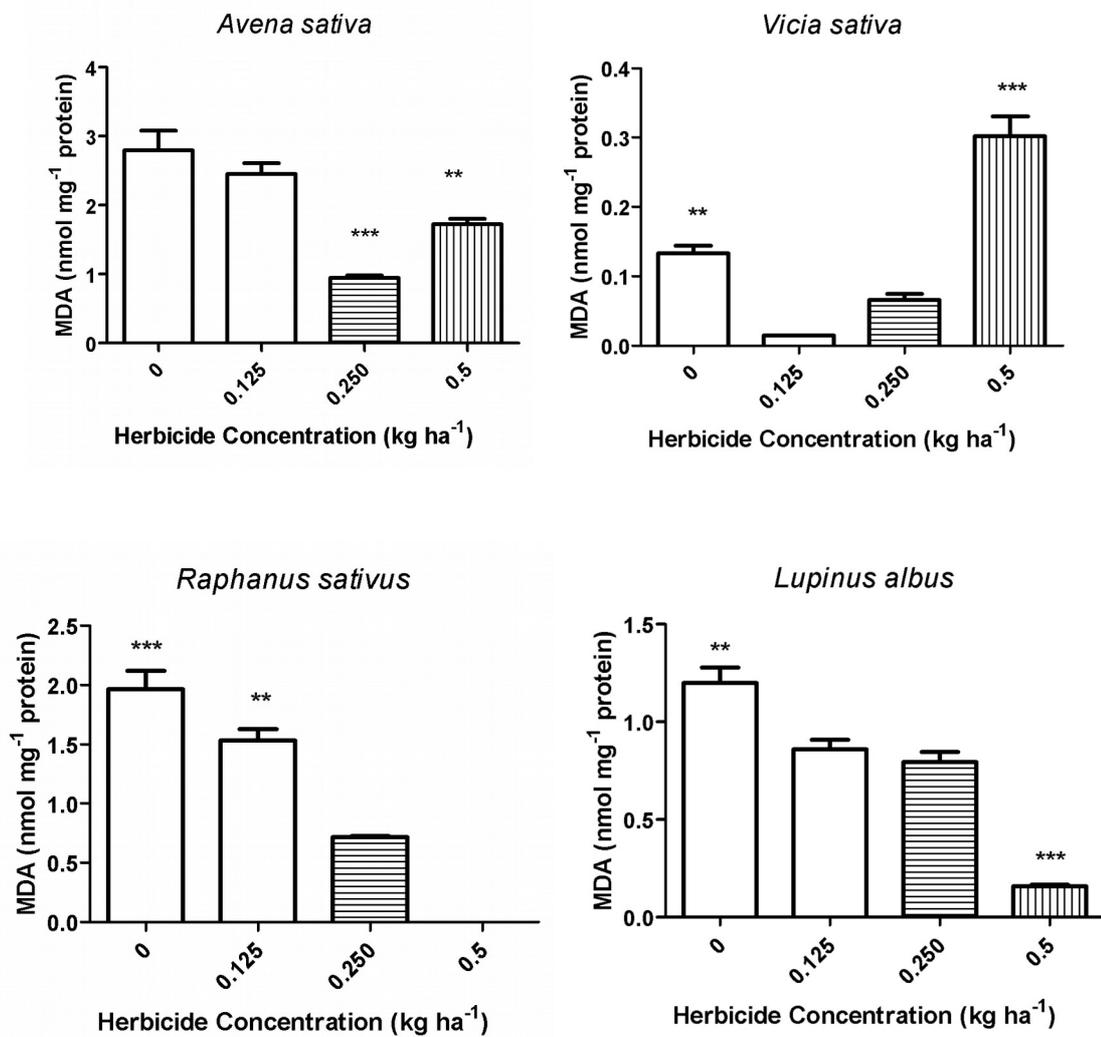


Fig 5. Effect of fomesafen on levels of lipid peroxidation in different species. Data represent the mean  $\pm$  SD of three different experiments. Different from control at  $p < 0.05$ .

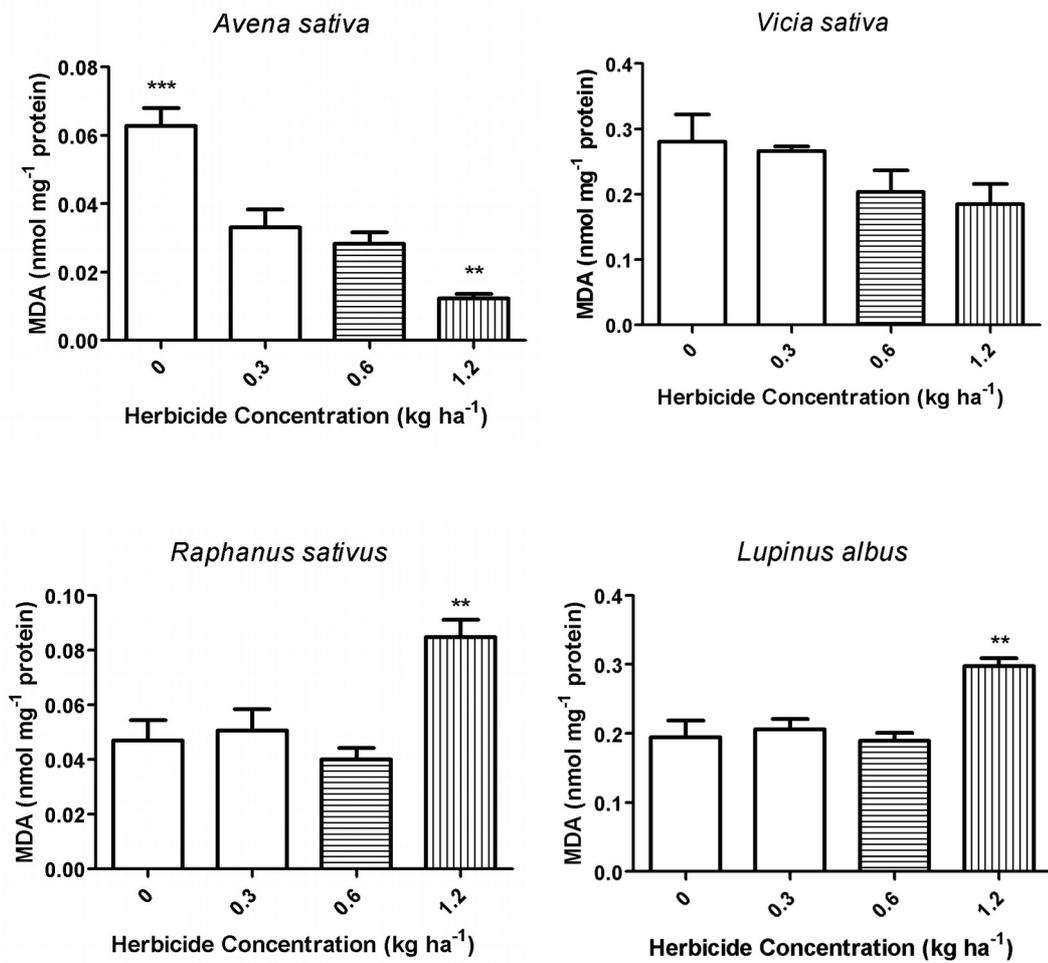


Fig 6. Effect of sulfentrazone on levels of lipid peroxidation in different species. Data represent the mean  $\pm$  SD of three different experiments. Different from control at  $p < 0.05$ .

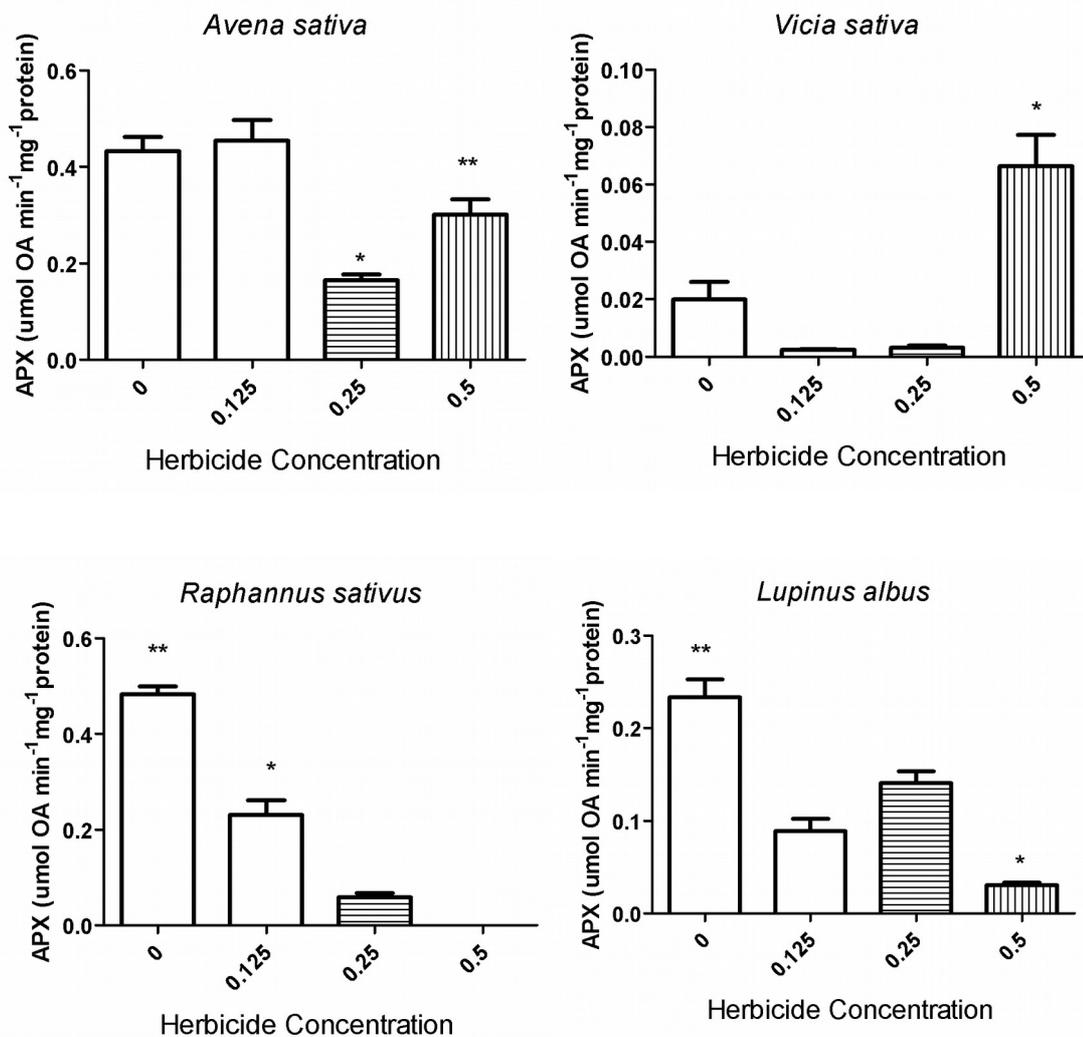


Fig 7. Effect of fomesafen on Ascorbat peroxidase APX in different species. Data represent the mean  $\pm$  SD of three different experiments. Different from control at  $p < 0.05$ .

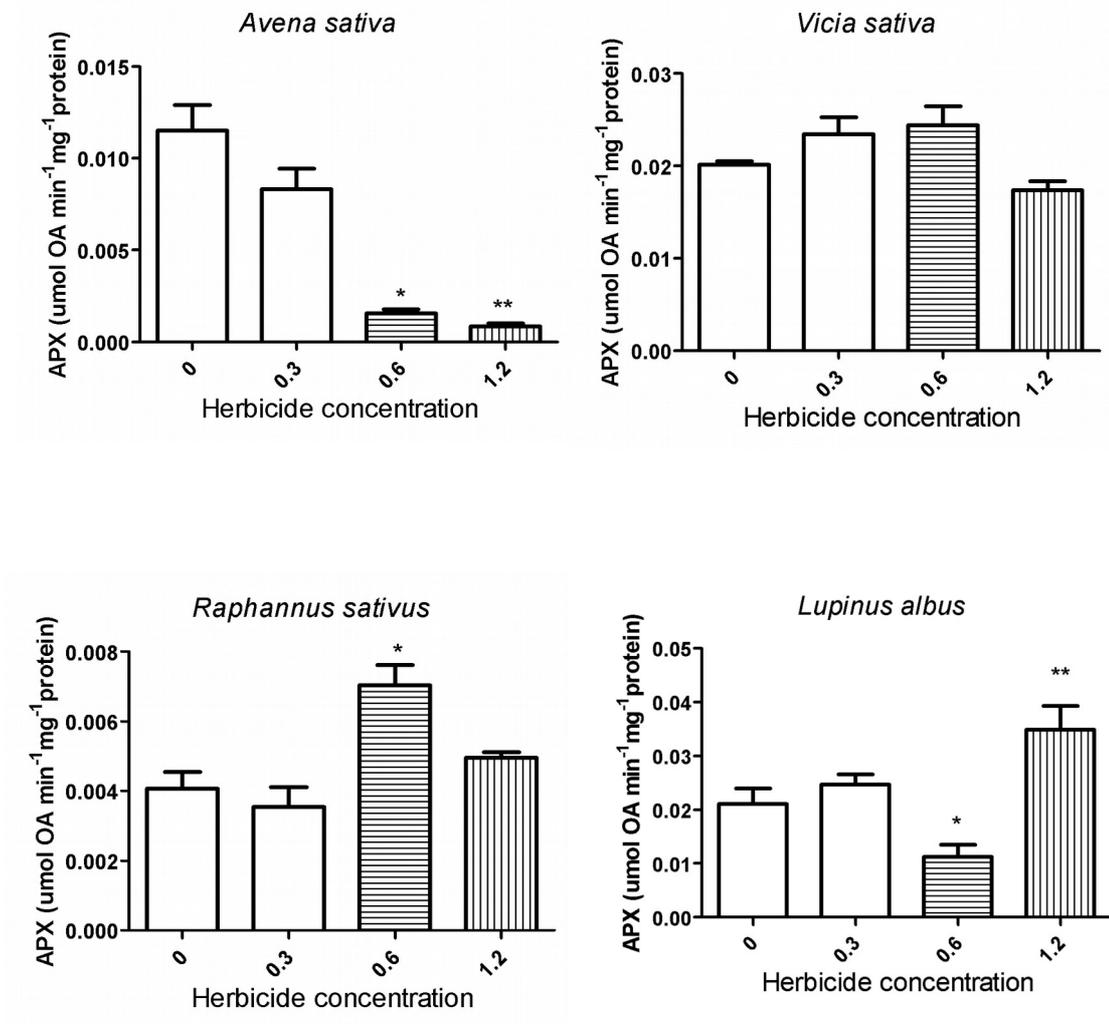


Fig 8. Effect of sulfentrazone on Ascorbat peroxidase APX in different species. Data represent the mean  $\pm$  SD of three different experiments. Different from control at  $p < 0.05$ .

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O cornichão foi a espécie menos tolerante aos herbicidas e desse modo não apresenta potencial para fitorremediar solos tratados com sulfentrazone e fomesafen.
- A aveia preta foi pouco afetada pela aplicação de diferentes doses de fomesafen, porém demonstrou alta suscetibilidade ao herbicida sulfentrazone.
- O nabo apresentou tolerância apenas até a dose de  $0,25 \text{ kg ha}^{-1}$  do fomesafen, enquanto que para o sulfentrazone a espécie apresentou tolerância.
- A espécie mais tolerante aos herbicidas fomesafen e sulfentrazone, indiferentemente da dose aplicada foi o tremoço, de modo que apresenta uma possível alternativa para a fitorremediação de solos com esses herbicidas.
- Para o fomesafen, a mucuna preta e a crotalária apresentaram as menores alterações das variáveis testadas, quando submetidas a dose de  $0,5 \text{ kg ha}^{-1}$ .
- As espécies mucuna preta, milheto e sorgo toleraram o herbicida fomesafen até a dose recomendada ( $0,25 \text{ kg ha}^{-1}$ ).
- Entre os herbicidas testados, o sulfentrazone apresentou maior efeito tóxico sobre as espécies, ocasionando a morte das plantas mesmo com a aplicação da metade das doses.
- A plantas de aveia preta, ervilhaca, nabo, cornichão e tremoço, apresentaram poucos efeitos significativos em suas características fisiológicas avaliadas.
- O tremoço apresentou o melhor comportamento frente aos herbicidas fomesafen e sulfentrazone, ao se avaliar as características relacionadas à fisiologia.
- O sulfentrazone apresentou os maiores efeitos tóxicos sobre a planta bioindicadora pepino, demonstrando maior efeito residual, enquanto o fomesafen apresentou as menores injúrias
- Os resultados demonstraram que ambos os herbicidas causaram alterações nas plantas causando estresse oxidativo, promovendo respostas do sistema antioxidante.
- Para a ervilhaca e nabo na dose de  $0,5 \text{ kg ha}^{-1}$  de exposição ao fomesafen, ocorreu aumento nos níveis de peroxidação lipídica. Sulfentrazone causou estresse oxidativo às plantas de ervilhaca, nabo e tremoço, na dose de  $1,2 \text{ kg ha}^{-1}$ .
- Aveia apresentou as menores alterações no sistema antioxidante quando exposta ao dobro da dose de fomesafen ( $0,5 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e sulfentrazone ( $1,2 \text{ kg ha}^{-1}$ ).

Diante do exposto nos cinco artigos, as espécies de inverno: aveia, ervilhaca e tremoço, e as espécies de verão: crotalária, milheto, mucuna preta e sorgo apresentam potencial na fitorremediação de solos poluídos com os herbicidas fomesafen e sulfentrazone. Os resultados obtidos no presente estudo são bastante promissores, pois evidenciam o grande

potencial fitorremediador de espécies de inverno e verão com valor econômico para a região Norte do Rio Grande do Sul, podendo trazer grandes benefícios à agricultura.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

Accioly, A. M. A.; Siqueira, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: Novais, R. F.; Alvarez V.; V. H.; Schaefer, C. E. G. R. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. v. 1. p. 299-352.

Arthur, E. L. et al. Phytoremediation—An Overview. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 2005;24:109-122.

Apel, K., Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**. 2004;55:373-99.

Carmo, M.L. et al. Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**. 2008;26:301-313.

Cavalcanti, F. R. et al. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**. 2004;163:563–57

Chagas, R.M. **Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat**. [dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.

Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advanced Agronomy**. 1996:55-114.

Dan, H.A. et al. Atividade residual de herbicidas aplicados em pós-emergência na cultura da soja sobre o milho cultivado em sucessão. **Planta Daninha**. 2011;29:663-671.

Duke, S.O. et al. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. **Weed Science**. 1991;39:465–473.

Flowers, T.J. et al. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany**. 2000;51:99-106.

Foyer, C. H. e Nott, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New phytologist**. 2000:359-388.

Galon, L. et al. Potential of plant species for bioremediation of soils applied with imidazolinone herbicides. **Planta Daninha**. 2014;32;4:719-726.

Hess, F.D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**. 2000;48:160-170.

- Joner, E.J. e Levval, C. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: A new aspect of rhizosphere interactions. **Sustainability Agronomic**. 2009:885- 894.
- Madalão, J.C. et al. Susceptibilidade de espécies de plantas com potencial de fitorremediação do herbicida sulfentrazone. **Revista Ceres**. 2011;60:111-121.
- Marchi, G., Marchi, E.C.S., Guimaraes, T.G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 36p.
- Marques, M. et al. Seedling emergence and biomass growth of oleaginous and other tropical species in oil contaminated soil. **Open Waste Management Journal**. 2010:26-32.
- Marques, M., Aguiar, C.R.C., Silva, J.J.L.S. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 2011;1-11.
- Marques, M., Rosa, G.S., Aguiar, C.C.R. Plants with potential for phytoremediation of oil-contaminated soil based on germination and biomass growth. In: **NATO/ CCMS Workshop on Management of Industrial Toxic Waste**, 4. 2006. 8p.
- Pires, F.R., et al. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta daninha**. 2003:335-341.
- Pires, F.R. et al. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 2005;9;4:627-634.
- Rodrigues, B.N. e Almeida, F.S. **Guia de herbicidas**. 6.ed. Londrina: Grafmarke, 2011. 697 p.
- Santos, J.B. et al. Fitorremediação do herbicida trifloxysulfuron sodium. **Planta Daninha**. 2004;22;2:323-330.
- Santos, J.B. et al. Fitorremediação de áreas contaminadas por herbicidas. In: Silva, A.A., Silva, J.F. **Tópicos em manejo integrado de plantas daninhas**. 2007, 367 p.
- Scramin, S.; Skorupa, L. A.; Melo, I. S. Utilização de plantas na remediação de solos contaminados por herbicidas – levantamento da flora existente em áreas de cultivo de cana-de-açúcar. In: Melo, I. S. et al. **Biodegradação**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. p. 369-371.
- Silva, C.M.M., Freitas, S.P., Rosa, R.C.C. Efeito residual da aplicação de fluazifop-p-butil + fomesafen em solos com plantas-teste. **Ciência Rural**. 2007;37;5:1450-1452.

Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Para Defesa Vegetal – SINDIVEG. Importações de defensivos agrícolas têm aumento no primeiro semestre de 2016. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/importacoes-de-defensivos-agricolas-tem-aumento-no-primeiro-semester-de-2016/>>. Acesso em: 01/09/2016.

Vidal, R.A. **Ação dos herbicidas**. Porto Alegre: Ribas Vidal, 2002. 89 p.

Zhu, J. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review Plant Biology**. 2002;53:247–273.

Moosavi, S.G. e Seghatoleslami, M.J. Phytoremediation: A Review. **Advance in Agriculture and Biology**. 2013;1:5-11.