

Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol

República Federativa do Brasil

Luís Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimárzio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Dietrich Gerhard Quast

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca

Herbert Cavalcante de Lima

Mariza Marilena T. Luiz Barbosa

Diretores-Executivos

Embrapa Meio Ambiente

Paulo Choji Kitamura

Chefe Geral

Geraldo Stachetti Rodrigues

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Cristina Martins Cruz

Chefe-Adjunto de Administração

Ariovaldo Luchiari Junior

Chefe-Adjunto de Comunicação Empresarial



ISSN 1516-4691

Fevereiro, 2003

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 30

Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva
Elisabeth Francisoni Fay

Jaguariúna, SP
2003

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3867-8750 Fax: (19) 3867-8740
sac@cnpma.embrapa.br
www.cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Geraldo Stachetti Rodrigues
Secretário-Executivo: Nilce Chaves Gattaz
Membros: Roberto Cesnik, Wagner Berttiol, Shirlei Scramin, Júlio Ferraz de Queiroz, Aldemir Chaim, Heloisa Ferreira Filizola, Flavio Dynia

Supervisor Editorial: Nilce Chaves Gattaz, Silvana Cristina Teixeira
Revisor de texto: Maria Cristina Tordin
Normalização Bibliográfica: Maria Amélia de Toledo Leme
Tratamento de Ilustrações: Alexandre Rita da Conceição
Foto(s) da Capa:
Editoração eletrônica: Alexandre Rita da Conceição

1º edição

1º impressão: 2003, tiragem: 400 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no seu todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

SILVA, Célia Maria M. Souza.

Impacto ambiental do regulador de crescimento vegetal paclobutrazol/

Célia Maria M. de Souza; Elisabeth Francisconi Fay.- Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003.

105 República Federativa do Brasil

Luis Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio

Presidente

Clayton Campanhola

Autores

Andréa Maria Spessoto

Bióloga, Doutora em Genética e Evolução
Embrapa Meio Ambiente
E-mail: spessoto@cnpma.embrapa.br

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva

Bióloga, Doutora em Microbiologia Aplicada
Embrapa Meio Ambiente
E-mail: celia@cnpma.embrapa.br

Cláudio Martin Jonsson

Farmacêutico Bioquímico, M. Sc. em Toxologia
Embrapa Meio Ambiente
E-mail: jonsson@cnpma.embrapa.br

Elisabeth Francisconi Fay

Farmacêutica Bioquímica, M. Sc. em Microbiologia
Aplicada
Embrapa Meio Ambiente
E-mail: bethfay@cnpma.embrapa.br

Lourival Costa Paraíba

Matemático, Doutor em Matemática Aplicada
Embrapa Meio Ambiente
E-mail: lourival@cnpma.embrapa.br

Raquel Ghini

Eng. Agrônoma, Doutora em Fitopatologia
Embrapa Meio Ambiente
E-mail: raquel@cnpma.embrapa.br

Rosana Faria Vieira

Eng. Agrônoma, Doutora em Microbiologia do Solo
Embrapa Meio Ambiente
E-mail: rosana@cnpma.embrapa.br

Vera Lúcia Ferracini

Química, Doutora em Química Orgânica
Embrapa Meio Ambiente
E-mail: veraf@cnpma.embrapa.br

Vera Lúcia S. S. de Castro

Médica Veterinária, Doutora em Toxicologia

Embrapa Meio Ambiente

E-mail: castro@cnpma.embrapa.br

Wellington Luiz de Araújo

Biólogo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas

Esalq/USP

E-mail: wlaraujo@esalq.usp.br

Apresentação

A população humana e sua demanda por alimentos continua a crescer, sendo que o nível de produtividade que a sociedade atual exige da moderna agricultura não parece ser possível sem o uso de xenobióticos. No entanto, há a necessidade de que o aumento do uso dos recursos solo e água ocorra por caminhos que assegurem a produtividade sustentável. Para isso, pesquisadores e usuários destes recursos precisam entender melhor o manejo dos processos que regulam a fertilidade do solo. Estudos sobre a biodiversidade e conservação dos organismos do solo, a estrutura das interações tróficas de suas comunidades e sua função no ecossistema, além das possibilidades para o manejo das práticas de uso agrícola na promoção da sustentabilidade estão entre estes conhecimentos. Além disso, somente o uso e o manejo adequados dos xenobióticos podem resultar em ganhos de produtividade, sem ocasionar contaminação nos alimentos e no ambiente.

O destino de um xenobiótico do seu ponto de aplicação, pela superfície do solo e, dentro do subsolo, é governado pelos processos interativos de adsorção, transformação e transporte. O entendimento da ciência que está por trás destas rotas de dissipação é uma das chaves para assegurar o seu uso ambientalmente correto. Também é fundamental o desenvolvimento e validação de modelos computacionais como ferramentas preditivas nas avaliações do impacto ambiental destes produtos.

Existe um consenso de que o impacto ambiental de um xenobiótico depende de alguns critérios, entre eles: 1) a quantidade do ingrediente ativo aplicado e o local de aplicação; 2) a partição e a concentração nos compartimentos ar, solo e águas superficiais e subterrânea; 3) a taxa de degradação em cada compartimento e 4) sua toxicidade às espécies presentes nestes compartimentos. Portanto, não é surpreendente a existência de vários métodos para avaliar o impacto ambiental dos xenobióticos.

Este documento considera a avaliação do impacto ambiental do uso do regulador de crescimento vegetal paclobutrazol pelos resultados de pesquisas realizadas por pesquisadores de diferentes áreas de conhecimento, envolvendo desde a dispersão até a toxicologia do composto (microrganismos do solo e do filoplano de folhas de mangueira e mamíferos).

As Editoras

Sumário

Capítulo 1. Paclobutrazol - Regulador de Crescimento Vegetal	9
Capítulo 2. Xenobióticos e seus Impactos Ambientais	15
Capítulo 3. Efeito de Paclobutrazol na Microbiota do Filoplano de Mangueiras	37
Capítulo 4. Efeito do Paclobutrazol sobre a Microbiota do Solo	49
Capítulo 5. Degradação do Paclobutrazol em Solos Tropicais	65
Capítulo 6. Análise do Polimorfismo de Bactérias Degradoras do Paclobutrazol	71
Capítulo 7. Avaliação de Risco em decorrência da Exposição Perinatal ao Paclobutrazol: análise de alguns indicadores físicos e neurocomportamentais	81
Capítulo 8. Toxicidade do Paclobutrazol em Ambiente Aquático	91

1

Paclobutrazol - Regulador de Crescimento Vegetal

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva

Elisabeth Francisconi Fay

Cláudio Martin Jonsson

Os reguladores de crescimento são compostos químicos sintéticos utilizados em sistemas agrícolas com o propósito de controlar o crescimento vegetativo, aumentando a capacidade reprodutiva da planta. Entre estes compostos está o paclobutrazol [(2RS, 3RS) -1- (4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) pentan-3-ol], cujo modo de ação é a inibição da síntese da giberelina (Quadro 1.1). O composto ativo alcança os meristemas subapicais da planta inibindo a oxidação do kaureno para ácido kaurenóico, o qual é precursor do ácido giberélico. O resultado é a redução da divisão celular sem ocasionar citotoxicidade e a consequência morfológica direta é a redução do vigor vegetativo. Este composto é importante na cultura da manga para o controle do crescimento, redução da poda e manipulação do cultivo para a expansão da produção. O grau de resposta no crescimento e floração varia com a cultivar, com o método de aplicação do produto e com a concentração utilizada.

O paclobutrazol pode ser aplicado nas folhas ou diretamente no solo. É absorvido passivamente pelas raízes, caule e folhas e tem movimento acropétalo dentro da planta, movendo-se pelo xilema para folhas e brotos. Sua mobilidade no solo é relativamente baixa (Heling Class 1-2), reduzindo o perigo de contaminação pela lixiviação. O Kd (coeficiente de distribuição linear) variável é proporcional ao conteúdo de matéria orgânica, conteúdo de argila

e capacidade de troca catiônica do solo (Lever, 1986). Seus valores para o coeficiente de adsorção variam de 1,5m em solos arenosos para 22,5m em solos argilosos. Liga-se fortemente à matéria orgânica do solo e sua adsorção aumenta em pH baixo (Leonard, 1986). A perda do grupo funcional polar nesta molécula explica porque ela é pouco solúvel em água e possivelmente é adsorvida nos sítios hidrofóbicos da matéria orgânica (Jackson, 1996).

Este regulador de crescimento permanece ativo no solo por muitos anos podendo afetar severamente o crescimento e desenvolvimento dos cultivos subseqüentes pela redução do vigor vegetativo (Attyia et al., 1983; Hampton, 1988). A meia-vida do paclobutrazol varia com o tipo de solo e as condições climáticas. Chand & Lembi (1994), estudando a dissipação de compostos inibidores da síntese de giberelina em ambiente aquático, encontraram uma meia-vida de 24,4 dias para o paclobutrazol enquanto que no solo não houve dissipação até a amostragem de 168 dias após a aplicação do produto.

Em estudos mais recentes Adriansen & Ogaard (1997), verificaram que, após uma hora da aplicação, os resíduos do paclobutrazol em solução nutriente eram 54 a 64% do valor inicial aplicado. Observaram que o conteúdo do produto aplicado na solução nutriente diminuía gradualmente sendo que, no florescimento ainda permanecia 13 a 20% da quantidade aplicada. Quantidades mínimas foram degradadas após uma semana e 23% após quatro semanas. Os valores de K_d nos dois substratos estudados estiveram em torno de 140, porém foram menores em concentrações mais baixas do produto.

Mangueiras tratadas com paclobutrazol nas concentrações de 4 a 12g de ingrediente ativo por árvore, na Tailândia, não apresentaram resíduos mensuráveis do regulador de crescimento nos frutos. Em outros experimentos, no mesmo país, também não foram detectados resíduos em frutos coletados 189 dias após a aplicação foliar ($1500\mu\text{g g}^{-1}$) (Zeneca, s.d.). Já em folhas e frutos de videira, Hegazy (1993) observou que o paclobutrazol penetrava nas folhas

imediatamente após a sua aplicação. Observou ainda rápida degradação do produto no primeiro dia, seguida de lenta degradação. Na cultura do morango foi observado que os resíduos de paclobutrazol permaneciam ativos no solo por pelo menos 11 meses após a última aplicação do produto (McArthur & Eaton, 1987). Corpos de água superficiais nas proximidades de pomares são portanto susceptíveis à contaminação por este composto, com o risco de promover efeitos adversos em organismos que habitam esses compartimentos ambientais.

A complexidade de ecossistemas aquáticos tem produzido dificuldades na avaliação e predição de efeitos de xenobióticos no meio ambiente. Isto tem trazido complicações na tentativa de determinação de concentrações máximas permissíveis desses agentes em corpos de água receptores. A necessidade de entender e prever os efeitos dos xenobióticos tem promovido a pesquisa de vários indicadores fisiológicos e bioquímicos de compostos tóxicos indutores de estresse (Jimenez & Stegeman, 1990). A utilização destes bioindicadores baseia-se no fato de que os distúrbios no meio ambiente levam inicialmente a uma perturbação de uma reação bioquímica em um determinado organismo. Se estas alterações bioquímicas forem observadas com uma certa antecedência, pode ser possível a identificação de problemas ambientais antes que o ecossistema aquático como um todo seja afetado (Bucheli & Fent, 1995).

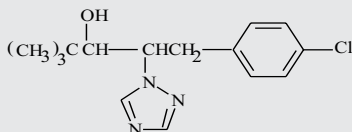
O paclobutrazol também apresenta propriedades fungicidas suprimindo o oídio (*Podosphaera leucotricha*) e a sarna da macieira (*Ventura inaequalis*) quando aplicado nas folhagens (Zeneca s.d.). Jacobs & Berg (2000) demonstraram o efeito inibidor deste composto sobre diversos fungos patogênicos da madeira. Também foi descrito por Deas & Clifford (1984) como sendo inibidor do crescimento fúngico, resultado também observado por Jackson et al. (1996), uma vez que é estruturalmente similar aos fungicidas do grupo triazole.

Considerando o potencial deste regulador na redução do crescimento vegetativo da manga e a sua persistência em solo,

aliado à falta de informação sobre o comportamento desta molécula nos diferentes agroecossistemas encontrados no Brasil, iniciativas da Embrapa Meio Ambiente tentam levantar informações laboratoriais imprescindíveis para a determinação das características deste princípio ativo em condições ambientais, em áreas vulneráveis à contaminação. Assim, pesquisadores desta instituição de pesquisa conduziram vários estudos visando o diagnóstico do impacto ambiental da aplicação do paclobutrazol. Os estudos foram realizados pela avaliação dos efeitos sobre a microbiota do solo e do filoplano nas folhas da mangueira, bem como sua degradação microbiológica e avaliação ecotoxicológica.

Quadro 1.1. Propriedades físico-químicas do paclobutrazol.

Fórmula estrutural:



Nome IUPAC: (2RS, 3RS) -1- (4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H- 1,2,4-triazol-1-yl) pentan-3-ol

Grupo químico: azol

Peso molecular: 293,8

Fórmula molecular: C₁₅H₂₀ClN₃O

Forma: sólidos cristalinos brancos

Ponto de ebulição: 165-166°C

Pressão de vapor: 0,001mPa (20°C)

SG/densidade: 1,22g mL⁻¹

K_{ow} LogP= 3,2

Solubilidade: 26mg L⁻¹ em água (20°C)
em solventes orgânicos (g L⁻¹)

Resistente à hidrólise (pH 4-9) e não degradado pela luz U.V. (pH 7, 10 dias).

Destino no ambiente: solo e água

1. geralmente no solo: DT₅₀ 0,5-1,0 ano
2. franco-argiloso calcáreo (pH 8,8, 14% M.O.): DT₅₀ < 42 dias
3. franco-arenoso (pH 6,8, 4% M.O.): DT₅₀ > 140 dias

Fonte : Worthing & Hance (1994)

Referências Bibliográficas

ADRIANSEN, E.; OGAARD, P. Residues of paclobutrazol and uniconazole in nutrient solutions from ebb and flood irrigation of pot plants. *Scientia Horticulturae*, v. 69, n. 1-2, p. 73-83, 1997.

ATTIYA, H. J.; FIELD, R. J.; HILL, G. D. Effects of PP333 and TIBA growth regulators on development and yield components of spring sown field beans (*Vicia faba* L.) *Proceedings of the Agronomy Society of New Zealand*, v. 13, p. 81-87, 1983.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 25, n. 3, p. 201-268, 1995.

CHAND, T.; LEMBI, C. A. Dissipation of gibberelin synthesis inhibitors in small-scale aquatic systems. *Journal of Aquatic Plant Management*, v. 32, p. 15-20, 1994.

DEAS, A. H. B.; CLIFFORD, D. R. Reductive and oxidative metabolism of triazolymethanes by two basidiomycete fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 22, p. 276-284, 1984.

HAMPTON, J. G. Effect of growth retardant soil residues on succeeding agricultural crops. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, v. 16, p. 167-172, 1988.

HEGAZY, M. E. A. Residual behaviour paclobutrazol on and fruits and leaves of vine crops. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, v. 71, n. 1, p. 103-110, 1993.

JACKSON, M. J.; LINE, M. A.; HASAN, O. Microbial degradation of a recalcitrant plant growth retardant-paclobutrazol (PP333). *Soil Biology and Biochemistry*, v. 28, n. 9, p. 1265-1267, 1996.

JACOBS, K. A.; BERG, L. C. Inhibition of fungal pathogens of woody plants by the plant growth regulator paclobutrazol. *Pest Management Science*, v. 56, p. 407-412, 2000.

JIMENEZ, B. D.; STEGEMAN, J.J. Detoxication enzymes as indicators of environmental stress on fish. *American Fisheries Society Symposium*, v. 8, p. 67-69, 1990.

LEONARD, W. F. Cultar- a plant growth regulator for horticulture. *New Zealand Agricultural Science*, v. 20, p. 195-202, 1986.

LEVER, B. G. Cultar-a technical overview. *Acta Horticulturae*, v. 179, p. 459-466, 1986.

McARTHUR, D. A. J.; EATON, G. W. Effect of fertilizer, paclobutrazol and chlormequat on strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 112, n. 2, p. 241-246, 1987.

WORTHING, C. R.; HANCE, R. H. (Ed.). *The pesticide manual*. 11. ed. Farnham: The British Crop Protection Council, 1994. p. 765-766.

ZENECA. *Cultar*: technical bulletin. [S.l.: s.n.], [19—?]. p. 9.

2

Xenobióticos e seus Impactos Ambientais

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva

Elisabeth Francisconi Fay

Vera Lúcia S. S. Castro

Os xenobióticos são, por definição, compostos sintetizados pelo homem, cujo comportamento no solo é governado por vários parâmetros, entre eles, as propriedades das moléculas destes compostos. As de maior importância são as propriedades químicas, estruturais e físicas, como por exemplo, a solubilidade em água, constante de dissociação e pressão de vapor. A disseminação de um xenobiótico, após a sua descarga no ambiente, é determinada pela sua partição entre as fases sólida/líquida/gasosa do sistema e de seu potencial para concentrar na biota. Esses processos são determinantes do grau de extensão do impacto biológico do produto e sua distribuição nos diferentes compartimentos do sistema. Os xenobióticos considerados persistentes podem permanecer quimicamente ativos no solo por muitos anos, e ter efeitos negativos sobre a saúde humana enquanto que aqueles não persistentes tendem a desaparecer em pouco tempo após a aplicação.

Quando aplicados nas doses recomendadas, a dimensão do impacto ou mesmo do efeito transitório na microflora do solo depende dos componentes que constituem aquele sistema (Schäffer, 1993). Em concentrações excessivas, estes efeitos podem ser inibitórios e não raro estimulatórios ao crescimento de microrganismos, principalmente àqueles que já estiverem adaptados à presença da molécula. Portanto, as populações microbianas do solo podem ser eliminadas, significativamente reduzidas ou alteradas.

A utilização dos xenobióticos por microrganismos onde deriva algum benefício nutricional do processo pela utilização do composto como fonte de carbono e energia, ou outro nutriente, é chamada de metabolismo. Este processo resulta na completa mineralização das moléculas orgânicas, isto é, sua conversão para dióxido de carbono, água e íons inorgânicos. Esta rota metabólica consiste de uma série de reações seqüenciais de transformação, cujo propósito é a conversão do xenobiótico em moléculas que possam ser processadas pelo metabolismo intermediário ou central, servindo como precursores para a biossíntese dos constituintes celulares (Janke & Fritsche, 1985). A energia necessária aos propósitos biossintéticos é derivada da oxidação completa da porção remanescente para CO₂ e água.

No entanto, muitos microrganismos são capazes de transformar parcialmente os compostos químicos em produtos que não produzem energia para o seu crescimento, isto é, transformam um substrato que não promove o crescimento na presença obrigatória de outro substrato que promova o crescimento ou outro composto biotransformável. Este processo é denominado de cometabolismo e é tipicamente um fenômeno celular. Sua especificidade biológica é caracterizada pelo metabolismo de diferentes substâncias na célula (Govlev, 1978). Pesquisas sobre estas transformações cometabólicas microbianas revelam que estes processos são normalmente atribuídos a atividade de enzimas não específicas do metabolismo periférico celular, capazes de modificar outras substâncias que não são seus substratos naturais.

Antes da ocorrência do processo de degradação de muitos compostos orgânicos, é observado um período no qual não fica evidente a dissipação da molécula orgânica. Este intervalo de tempo é denominado de período de aclimação ou algumas vezes de período de adaptação ou *fase lag* (Alexander, 1999). Este período pode variar muito, dependendo do composto e de sua concentração, além das condições ambientais.

Após o período de adaptação, a velocidade em que ocorrem as reações metabólicas pode ser mais lenta ou mais rápida, porém

caso haja uma segunda adição do composto orgânico durante o período de metabolismo ativo, ocorre dissipação do segundo incremento sem ocorrer o período de adaptação. Neste caso, a taxa de biodegradação pode aumentar com outras aplicações subseqüentes. Este comportamento foi observado em solos suplementados com 4-nitrofenol (Spain et al., 1980), benomil (Yarden et al., 1985), carbendazim (Aharonson et al., 1990) e carbofuran (Karpouzias et al., 2001).

A adaptação da comunidade microbiana para um determinado substrato freqüentemente resulta na adaptação simultânea para outros, mas não a todas as moléculas estruturalmente relacionadas. Como as espécies individuais freqüentemente atuam em vários substratos estruturalmente relacionados, as espécies favorecidas pela primeira aplicação do composto orgânico podem então rapidamente destruir os análogos (Soulas et al., 1983; Alexander, 1999). Os compostos químicos com estrutura similar, degradados pela mesma rota, conduzem a degradação acelerada de outros compostos, fenômeno este denominado de degradação cruzada. Uma vez detectada esta condição, torna-se necessário procurar outras alternativas de manejo de agrotóxicos, tais como rotacionar diferentes tipos de compostos químicos conforme as variações entre estações, prevenindo assim o enriquecimento da flora degradadora.

Comportamento dos xenobióticos no solo

Os xenobióticos persistentes podem permanecer quimicamente ativos no solo por muitos anos, e podem ter efeitos negativos sobre a saúde humana, enquanto que os xenobióticos não persistentes desaparecem pouco tempo após a aplicação. A transferência das substâncias potencialmente tóxicas na cadeia alimentar depende da estrutura dos compostos em questão e de sua natureza química. Portanto, os xenobióticos, como poluentes, podem criar um problema ambiental, devido a sua persistência e toxicidade.

Define-se como comportamento de um xenobiótico a maneira da molécula agir em determinado ambiente. Este comportamento em solo e água, é regulado pelas propriedades dos compostos, do

meio e das condições climáticas. As propriedades importantes incluem: ionizabilidade (pK_A), solubilidade em água (S), pressão de vapor (VP), retenção do solo (K_{oc}) e longevidade ($T_{1/2}$) (Weber, 1994). Muitos trabalhos citam propriedades adicionais às citadas (Rao & Davidson, 1980; Pignatello & Huang, 1991), no entanto pode-se considerar as já citadas como propriedades chaves. O conjunto de todas as propriedades físicas e químicas dos xenobióticos seria a circunstância ideal para prever o comportamento de um dado composto no ambiente.

Por outro lado, o destino é o resultado final que é dado a uma molécula após a sua entrada e atuação no ambiente, mediante os processos de retenção, transformação e transporte e a interação íntima entre eles. O entendimento do destino de um composto químico no ambiente, portanto, inclui o entendimento do papel destes três processos para este composto. Assim, avaliações do destino de um pesticida no ambiente precisam incluir uma estimativa de todos os processos que possam potencialmente afetar este composto (Lavorenti, 1996).

Dentre os processos que governam o comportamento dos xenobióticos no ambiente, a sorção é o processo fundamental que determina a disponibilidade para a sua ação, seja em relação aos organismos-alvo e não-alvo e à sua degradação no solo. Os fatores que influenciam este processo incluem as propriedades químicas do composto aplicado e as características do solo, especialmente a matéria orgânica, conteúdo de argila, umidade do solo e pH. Se o composto for ligado primeiramente a um constituinte do solo (por exemplo caulinita ou areia), ele será rapidamente mineralizado em taxa e extensão equivalentes como se tivesse sido adicionado ao solo em solução aquosa. Quando os compostos ligam-se primeiramente a outros constituintes do solo (por exemplo montmorilonita, ácidos fúlvicos ou ácidos húmicos), suas mineralizações são quase sempre mais lentas ou inexistentes, sendo que, normalmente, a interação com estes constituintes do solo inibem a degradação (Knaebel et al., 1996).

Variáveis inerentes à aplicação do composto orgânico também devem ser consideradas pois estudos de degradação normalmente consideram o ingrediente ativo, enquanto que os xenobióticos são aplicados formulados e estas formulações podem alterar a degradação pela modificação na disponibilidade do composto. Por exemplo, alguns surfactantes aumentam a solubilidade dos compostos pouco solúveis em água, reduzindo assim sua sorção (Jafvert et al., 1994). A incorporação de aditivos pode também afetar diretamente a microflora do solo, seja pela toxicidade aos microrganismos, seja pela atuação como fonte de carbono.

Avaliações realizadas em laboratório para verificar a influência destes fatores na degradação do fungicida triticonazole, demonstraram que em condições ótimas para o crescimento microbiano (28°C e 80% da capacidade de campo), a degradação deste composto foi lenta, indicando alta estabilidade da molécula, comum aos fungicidas do grupo triazole (Beigel et al., 1999). A cinética lenta e linear da mineralização é característica do processo de cometabolismo. Houve influência positiva da temperatura e não houve efeito significativo da formulação. A proporção de resíduos ligados resultantes das interações da molécula com os colóides do solo foi positivamente relacionada à extensão da mineralização com maior formação de resíduos ligados nas temperaturas mais elevadas e nas menores doses aplicadas.

Para os herbicidas norflurazon e trifluralina foi verificado que temperaturas mais baixas e condições de clima seco levaram ao aumento da persistência desses compostos no solo (Schoroeder & Banks, 1986; Jolley & Johnstone, 1994). Em áreas com verão quente e seco e inverno frio e úmido, foi observado que as diferenças encontradas para meia-vida do norflurazon (1996= 50 dias e 1997= 22 dias), estiveram relacionadas com a precipitação. Em 1996 uma leve chuva após a aplicação do herbicida pode ter ajudado a incorporação do composto ao solo devido a sua alta mobilidade e, conseqüentemente, pode ter levado a uma menor perda por volatilização. Por outro lado, o processo de lixiviação pode ter contribuído para a dissipação do norflurazon no solo. Da mesma forma, o herbicida oxadiazon tem sua dissipação afetada

pelo clima ou o teor de umidade (Barret & Lavy, 1984; Ying & Williams, 2000). Devido a baixa mobilidade, a maior parte dos herbicidas trifluralina, oxadiazon e oxifluorfen permaneceu na superfície do solo onde a dissipação poderia ser afetada pela degradação química ou microbiológica e pelo processo de volatilização. No caso da trifluralina, Ying & Williams (2000) encontraram meia-vida de 27-30 dias, valores mais baixos do que os encontrados por outros autores (Wauchope et al., 1991; Jolley & Johnstone, 1994). Este fato deve-se a não incorporação da trifluralina ao solo. Portanto, a meia vida é controlada por muitos fatores, sendo que cada composto tem comportamento diferenciado em diferentes condições.

Os riscos ambientais não devem ser somente avaliados com base nos efeitos observados na vizinhança imediata de um ponto de descarga. Os xenobióticos podem ser transportados à longas distâncias e podem então ser recuperados em amostras colhidas em pontos remotos do local de descarga inicial. Este fato é importante, principalmente, em compostos mais persistentes como os organoclorados, exemplo: bifenilas policloradas (PCBs), PCCs, PCDDs, PCDFs e outros agroquímicos. A confirmação deste fato ocorre pela recuperação destas moléculas nas diferentes matrizes ambientais (Neilson, 2000), demonstrando que eles não são degradados e, portanto, são recalcitrantes.

Efeito dos xenobióticos sobre microrganismos não-alvo

A qualidade do solo pode ser definida como a capacidade do solo funcionar dentro de um ecossistema, sustentando a produtividade biológica, mantendo a qualidade ambiental e promovendo o crescimento da planta e a saúde animal (Doran & Parkin, 1994). Muitas propriedades podem ser usadas para definir a qualidade do solo e, uma vez quantificadas, podem ser definidas e utilizadas determinadas estratégias para o manejo deste solo. Parâmetros físicos, químicos como matéria orgânica, estado nutricional, medida de escoamento superficial ou conteúdo de agregados do solo podem ser utilizados. Estes parâmetros modificam lentamente e, portanto, muitos anos são necessários para medir as modificações que sejam

significativas. Por outro lado, as propriedades bioquímicas e biológicas são responsáveis pelas pequenas alterações que ocorrem no solo, fornecendo desta forma informações imediatas e exatas nas modificações de sua qualidade. É por isso que a atividade microbiana tem uma influência direta na estabilidade e fertilidade do ecossistema (Smith et al., 1993). Os microrganismos têm papel fundamental no estabelecimento dos ciclos biogeoquímicos e estão envolvidos na estrutura dos solos (Harris & Birch, 1989).

Os métodos utilizados para estimar o crescimento microbiano incluem contagem de microrganismos (contagem em placa ou microscópio) e a determinação da biomassa microbiana que, apesar de ser pequena em relação ao carbono orgânico é uma fonte lábil de nutrientes. Contudo, estas medidas não dão indicações de atividade. Índices específicos de atividade incluem dentre outros: microcalorimetria, taxas de respiração, medidas de ATP nos extratos de solo e atividades enzimáticas.

1. Alguns métodos utilizados na avaliação do efeito de xenobióticos na microbiota do solo.

1.1. Contagem em placa

Uma das técnicas tradicionalmente utilizadas para avaliar as respostas diferenciais das comunidades microbianas do solo, quando expostas à presença de xenobióticos, é a contagem de microrganismos em placa, utilizando-se uma grande variedade de meios de cultura com o objetivo de maximizar a recuperação das diferentes espécies microbianas do solo (Thompson et al., 1999). Apesar disso, existem estimativas de que menos de 0,1% dos microrganismos encontrados em solos agrícolas são cultiváveis nestes meios de cultura quando comparados à técnica de contagem microscópica dos microrganismos (Atlas & Bartha, 1998; Riis et al., 1998). Isto é devido a seletividade do meio e a incapacidade de muitas células em formar colônias (Mikell et al., 1996). Por exemplo, segundo Kuznetsov et al. (1979), microrganismos oligotróficos geralmente não crescem em meio cujo substrato está na concentração abaixo de 10mg L⁻¹. Embora a técnica de

contagem de microrganismos em meios de cultura seletivos e/ou semi-seletivos, não seja a ideal para os estudos da composição das comunidades microbianas naturais quando usada sozinha, ela fornece um dos meios para o entendimento do hábito de crescimento, desenvolvimento e função dos microrganismos nos diferentes habitats.

1.2. Carbono da biomassa microbiana (Cmic)

A biomassa microbiana é definida como a parte da matéria orgânica do solo (usualmente entre 1 a 5%) constituída por microrganismos vivos menores que $5\text{-}10\mu\text{m}^3$ e responde prontamente às modificações químicas e físicas do ambiente. Esta biomassa não é estática e sua dinâmica temporal é considerada extremamente importante na determinação da extensão e liberação de nutrientes para outros componentes do ecossistema (McGill et al., 1986). Medidas do C da biomassa microbiana do solo fornecem indicações sobre as mudanças a longo prazo no conteúdo de matéria orgânica, antes que tais mudanças possam ser detectadas por técnicas convencionais. Embora medidas de C da biomassa microbiana tenham sido citadas como indicadores sensíveis da poluição do solo com pesticidas (Harden et al., 1993a; Harden et al., 1993b; Duah-Yentumi & Johnson, 1986), este método nem sempre tem sido o parâmetro mais adequado para avaliar o efeito tóxico de xenobióticos na microflora do solo (Olson & Lindwall, 1991; Hart & Brookes, 1996; Vieira, 1999; Vieira et al., 2000).

A biomassa microbiana pode não ser útil como indicador de toxicidade uma vez que ela representa a soma de uma grande variedade de espécies microbianas que variam na sua resposta aos poluentes. Os microrganismos resistentes a determinados pesticidas podem exceder em número aos organismos sensíveis e contribuir para uma maior medida da biomassa microbiana. No caso de fungicidas, por exemplo, pode-se observar uma queda na atividade microbiana geral do solo, sem um conseqüente decréscimo na biomassa microbiana, o que tem sido atribuído a uma queda na dominância da comunidade microbiana do solo, de fúngica para bacteriana (Chen et al., 2001).

1.3. Atividade enzimática

As enzimas do solo são os catalizadores biológicos de inúmeras reações que nele ocorrem. Apesar de algumas enzimas (ex. desidrogenase) ser encontradas somente em células viáveis, a maioria das enzimas pode também existir como exoenzimas secretadas pelos microrganismos ou como enzimas originárias de restos microbianos e resíduos de plantas. Estas estão estabilizadas em complexos de argilas minerais e colóides húmicos. Uma vez que é difícil extrair enzimas do solo, elas são estudadas indiretamente por meio da análise da medida de sua atividade. As análises são feitas *in vitro* sob condições controladas, o que dificulta o entendimento do que ocorre *in situ*. Apesar disto, o conhecimento do espectro da atividade enzimática de um solo é importante como indicativo do seu potencial para condução de processos bioquímicos básicos e essenciais para a manutenção da fertilidade (Garcia et al., 1994).

A desidrogenase é uma enzima capaz de fornecer a atividade microbiana do solo e conseqüentemente o seu grau de degradação. É considerada essencial nos estágios iniciais da oxidação da matéria orgânica do solo, pela transferência de hidrogênio e elétrons dos substratos para os aceptores (Alef, 1995). Muitas outras enzimas intracelulares ou sistemas enzimáticos contribuem para a atividade total da desidrogenase no solo (Nannipieri et al., 1990). Esta atividade enzimática apresenta como característica um alto grau de especificidade do substrato, é invariavelmente ligada à viabilidade de células intactas não acumulando extracelularmente no solo (Dick, 1997). Portanto, pode ser considerada como indicativa da atividade microbiana total do solo.

Apesar de existirem poucos trabalhos relacionando os efeitos dos reguladores de crescimento às atividades enzimáticas do solo, Gianfreda & Bollag (1996) ponderam que estes efeitos parecem depender de vários fatores, como por exemplo a natureza e dose do composto orgânico, tipo de enzima e solo e tipo de experimento (campo ou laboratório). Estes efeitos podem ser o

resultado da interação direta entre o xenobiótico e a enzima ou de interações indiretas resultantes das modificações no número de microrganismos, o que leva a alterações nos níveis de enzimas intra e extracelulares. Por outro lado, quando os xenobióticos são aplicados nas doses recomendadas, freqüentemente exibem um efeito estimulatório na atividade da desidrogenase (Dick, 1997). Porém, quando são aplicadas altas doses, o efeito sobre a enzima pode ser danoso (Dzantor & Felsot, 1991).

1.4. Conteúdo de ergosterol do solo

A avaliação do efeito dos xenobióticos no estabelecimento e sobrevivência dos fungos do solo é um importante aspecto do efeito colateral destes compostos orgânicos, pois estes organismos são os decompositores primários da matéria orgânica e, portanto, responsáveis pelo fluxo de energia no sistema solo.

Métodos indiretos para estudo destes microrganismos consistem na determinação da seleção de biomoléculas características de grupos específicos de organismos, como por exemplo, os lipídeos e a quitina. As análises podem ser qualitativas ou quantitativas, sendo que a determinação indireta quantitativa envolve a análise do ergosterol. Esta análise foi descrita por Wallander et al. (1997) como sendo um dos melhores indicadores da biomassa fúngica quando comparado aos outros métodos disponíveis. A premissa desta análise e técnicas semelhantes é que existe uma interrelação entre a concentração de um constituinte celular selecionado e a quantidade de biomassa existente (Newell, 1992 e 1995).

O ergosterol é o esteroide mais abundante na maior parte dos fungos eucomicetos, incluindo membros dos zigomicota, ascomicota, basidiomicota e deuteromicota (Weete, 1989). Os oomicetos e os uredoniales são exceções, por não possuírem esta molécula. Assim, o ergosterol é restrito a um grupo, taxonomicamente e ecologicamente bem definido de organismos. Sendo principalmente um componente de membrana, ele é indicativo do conteúdo citoplasmático de células metabolicamente ativas, portanto, basicamente um indicador de células fúngicas vivas (Kuhn et al., 1990; Newell, 1992).

Como o ergosterol é um importante componente quantitativo das células fúngicas (comumente próximo a 0,5% da massa orgânica) detecções analíticas não são problemáticas. No entanto, o conteúdo de ergosterol varia com a fase do crescimento fúngico e também varia entre as espécies. Muitos trabalhos têm mostrado que ele é maior em micélios jovens ou velhos do que em micélio na fase estacionária (Hung et al., 1985; Newell et al., 1987), demonstrando que cuidados devem ser tomados na interpretação dos resultados.

Também outros fatores como velocidade de crescimento, disponibilidade de nutrientes e carbono, temperatura e oxigênio, podem afetar o conteúdo de ergosterol micelial (Montgomery et al., 2000). Há evidências de que o histórico da manutenção da cultura da linhagem fúngica pode ser algumas vezes o fator que leva a níveis não naturais do conteúdo de ergosterol micelial (Stahl & Parkin, 1996; Wallander et al., 1997; Joergensen, 2000; Ruzicka et al., 2000). Em estudos com análise de isolados fúngicos, a média da concentração do conteúdo de ergosterol micelial está próxima a 5mg g^{-1} , sugerindo que um fator de correção derivado desta concentração permite estimar a biomassa fúngica de diversos sistemas naturais (Montgomery et al., 2000).

1.5. Comprimento da hifa viva

Este método consiste na contagem, em microscópio epifluorescente, do número de hifas extraídas de determinado solo. As hifas fúngicas metabolicamente ativas são estimadas após coloração com diacetato de fluoresceína, que torna-se fluorescente após a hidrólise enzimática (Bloem et al., 1995). Várias técnicas têm sido usadas para quantificar fungos no solo, mas sérias fontes de erros existem em todas elas. A avaliação da quantificação do comprimento de hifas, pela contagem em microscópio epifluorescente, tende a subestimar a população fúngica do solo e pode ser influenciada, em alto grau, pela subjetividade do observador. Apesar disso, esta técnica tem-se mostrado altamente sensível na determinação do efeito danoso de xenobióticos no solo (Vieira et al., 2000) quando o objetivo final é somente a comparação entre tratamentos de um mesmo tipo de solo.

Análise de risco

O crescimento da utilização de xenobióticos introduziu o conceito de análise de risco dentro da avaliação de impacto ambiental. O risco refere-se a probabilidade de um organismo ou determinada população sofrer dano. Esta avaliação pode ser realizada, identificando órgãos ou sistemas afetados que possam levar a enfermidades e desequilíbrios, estabelecendo as condições de exposição e dose do xenobiótico que levam ao dano e/ou enfermidade. No contexto ambiental, esta avaliação envolve a determinação dos efeitos de exposição das espécies sensíveis ao produto avaliado e a projeção desses efeitos.

A avaliação do risco da ocorrência de danos à saúde consiste geralmente de quatro fases: identificação do risco, análise dose-resposta, avaliação da exposição e caracterização do risco e seu gerenciamento (Kimmel, 1998). Estas fases permitem o estudo comparativo entre os agentes de risco, diferentes populações e diversos tempos de exposição:

1. identificação do risco - caracterização do agente e a sua dispersão ambiental;
2. análise dose-resposta - relação entre a dose/quantidade do agente e a resposta biológica a partir de testes toxicológicos e epidemiológicos. A utilização da extrapolação de dados interespecies, baseada em modelos farmacocinéticos/dinâmicos, permite o cálculo de doses de referência podendo utilizar fatores de segurança, geralmente dez vezes o valor da dose encontrada para neonatos e crianças;
3. avaliação da exposição - análise da magnitude e da duração da exposição ao agente e das diferentes rotas de ingresso no organismo;
4. caracterização do risco e seu gerenciamento – é baseada em modelos matemáticos, que combinam a exposição em humanos com dados de animais de laboratório (agudos, subcrônicos e

crônicos, por diferentes vias de exposição), e avaliação das consequências políticas, sociais, econômicas e de saúde pública.

Na avaliação de risco dos xenobióticos sobre organismos não-alvo, sugere-se estudos com organismos representativos dos ecossistemas brasileiros, pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar. Na escolha das espécies para estudos de patogenicidade/toxicidade deve ser considerada a ampla distribuição no território nacional, a facilidade de criação e manipulação em condições laboratoriais, ou em outra forma de cativeiro. Recomenda-se, na medida do possível, a utilização de espécies que, sendo predadoras ou não do organismo-alvo, se alimentem dele no seu habitat natural.

Já em relação ao homem, este seria o modelo ideal para avaliar os possíveis prejuízos gerados pelos xenobióticos. Entretanto, a coleta de dados no caso da exposição humana ocorre em casos acidentais, quando relatados. Nessas condições nem sempre é possível precisar, por exemplo, a natureza e a duração da exposição uma vez que as populações são móveis e estão expostas a múltiplos fatores ambientais. Os modelos com animais têm sido amplamente utilizados e o risco do efeito prejudicial para o ser humano é feito pela extrapolação interespecífica, baseado em modelos farmacocinéticos e fisiológicos de comparação. Tais resultados, quando tomados em conjunto, serão parte integrante de uma avaliação de risco à saúde humana.

Considerando que a avaliação de risco ecotoxicológico depende de uma comparação dos níveis de exposição com níveis que causem uma resposta biológica mensurável, é necessário o conhecimento dos níveis de concentração esperados ou níveis reais dos compostos em questão. A análise do risco de contaminação de populações expostas envolve o conhecimento das fontes de emissão dos contaminantes, das transformações, transporte e acúmulo no ambiente, das rotas de ingresso no organismo, das doses potenciais e internas, da biodisponibilidade, da dose biologicamente efetiva e de possíveis efeitos prejudiciais à saúde dos organismos.

1. Avaliação de risco à saúde

As principais vias de exposição do organismo aos xenobióticos no ambiente são: a) ingestão de alimento ou água; b) respiração; c) contato externo com a pele ou o exoesqueleto. A exposição do organismo ao xenobiótico pode ser proveniente de uma aplicação deliberada do composto químico para o controle de pragas em áreas agrícolas ou pode ser pela exposição indireta, quando o organismo está exposto a baixos níveis de resíduos remanescentes de uma aplicação, ou erosão em área não-alvo.

Os efeitos agudos decorrentes da exposição possibilitam a identificação de sinais e sintomas. No entanto, a exposição humana aos xenobióticos, seja pela exposição ambiental ou ocupacional, pode ocasionar patologias decorrentes de exposições frequentes, mesmo em pequenas doses. Entre as mais comuns estão as polineurites do sistema nervoso periférico, irritações tóxicas, distúrbios oftalmológicos, endocrinopatias e distúrbios reprodutivos. Frequentemente há presença de sintomas inespecíficos (tonturas, cefaléia, náuseas, tosse, dentre outros), até a presença de seqüelas neurológicas, como no caso dos fosforados e carbamatos. Apesar da observação e coleta de dados clínicos ou epidemiológicos das populações expostas serem uma boa forma de avaliação dos prejuízos à saúde, a interpretação desses dados é difícil, uma vez que na maioria dos casos da nossa realidade agrícola, estes não estão disponíveis para tal avaliação.

Referências Bibliográficas

- ALEF, K. Dehydrogenase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p. 228-231.
- AHARONSON, N.; KATAN, J.; AVIDOV, E.; YARDEN, O. The role of fungi and bacteria in the enhanced degradation of the fungicide carbendazim and the herbicide diphenamid. In: RACKE, K. D.; COATS, J. R. (Ed.). *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 113-127. (ACS Symposium Series, 426).
- ALEXANDER, M. *Biodegradation and bioremediation*. 2.ed. New York: Academic Press, 1999. 453p.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Redwood City: Benjamin/Cummings, 1998. 694p.
- BARRETT, M. R.; LAVY, T. Effects of soil water content on oxadiazon dissipation. *Weed Science*, v. 32, p. 697-701, 1984.
- BEIGEL, C.; CHARNAY, M. P.; BARRIUSO, E. Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 31, p. 525-534, 1999.
- BLOEM, J.; BOLHUIS, P. R.; VENINGA, M. R.; WIERINGA, J. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p. 162-173.
- CHEN, SHU-KANG; EDWARDS, C. A.; SUBLER, S. A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth. *Applied Soil Ecology*, v. 18, p. 69-82, 2001.

DICK, R. P. Soil enzymes activities as integrative indicators of soil health. In: PANKHURST, B. M.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R. (Ed.). *Biological indicators of soil health*. Wallingford: CAB International, 1997. p. 127-156.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W. (Ed.). *Defining soil quality for sustainable environment*. Madison: SSSA: ASA, 1994. p. 30-23. (SSSA Special Publication, 35).

DUAH-YENTUMI, S.; JOHNSON, D. B. Changes in soil microflora in response to repeated applications of some pesticides. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 18, p. 629-635, 1986.

DZANTOR, E. K.; FELSOT, A. S. Microbial responses to large concentrations of herbicides in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 10, p. 649-655, 1991.

GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; COSTA, F.; CECCANTI, B. Biochemical parameters in soils regenerated by the addition of organic wastes. *Waste Management and Research*, v. 12, p. 457-466, 1994.

GIANFREDA, L.; BOLLAG, G. M. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. In: STOTSKY, G., BOLLAG, J. M. (Ed.). *Soil biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1996. v. 9. p.123-193.

GOVLEV, E. L. Metabolism in *Nocardia* and actinomycetes. *Actinomycetes*, v. 13, p. 59-101, 1978.

HARDEN, T.; JOERGENSEN, R. G.; MEYER, B.; WOLTERS, V. Mineralization and formation of soil microbial biomass in a soil treated with simazine and dinoterb. *Soil Biology and Biochemistry* v. 25, p. 1273-1276, 1993a.

HARDEN, T.; JOERGENSEN, R. G.; MEYER, B.; WOLTERS, V. Soil microbial biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide treated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 25, p. 679-683, 1993b.

HARRIS, J. A.; BIRCH, P. Soil microbial activity in opencast coal mine restoration. *Soil Use and Management*, v. 5, p. 155-160, 1989.

HART, M. R.; BROOKES, P. C. Soil microbial biomass and mineralization of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 12, p. 1641-1649, 1996.

HUNG, B. H.; YUNG, K. H.; CHANG, S. T. The sterol composition of *Volvariella volvacea* and other edible mushrooms. *Mycologia*, v. 77, p. 959-963, 1985

JAFVERT, C. T.; VAN HOOFF, P. L.; HEATH, J. K. Solubilization of nonpolar compounds by nonionic surfactant micelles. *Water Research*, v. 28, p. 1009-1017, 1994.

JANKE, D.; FRITSCH, W. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *Journal of Basic Microbiology*, v. 23, p. 603-619, 1985.

JOERGENSEN, R. G. Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, p. 647-652, 2000.

JOLLEY, A. V.; JOHNSTONE, P. K. Degradation of trifluralin in three victorian soils under field and laboratory conditions. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 34, p. 57-65, 1994.

KARPOUZAS, D. G.; WALKER, A.; DRENNAN, D. S. H.; FROUD-WILLIAMS, R. J. The effect of initial concentration of carbofuran on the development and stability of its enhanced biodegradation in top-soil and sub-soil. *Pest Management Science*, v. 57, p. 72-81, 2001.

KIMMEL, C. Current approaches to risk assessment for developmental neurotoxicology. In: SLIKKER, W.; CHANG, L. *Handbook of developmental neurotoxicology*. New York: Academic Press, 1998. p. 675-685.

KNAEBEL, D. B.; FEDERLE, T. W.; McAVOY, D. C.; VESTAL, J. R. Microbial mineralization of organic compounds in an acidic agricultural soil: effects of preadsorption to various soil constituents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 11, p. 1865-1875, 1996.

KUHN, P. J.; TRINICI, A. P. J.; JUNG, M. J.; GOOSEY, M. W.; COPPING, L. G. (Ed.). *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

KUSNETSOV, S. J.; DIBININA, G. A.; LAPTEVA, N. A. Biology of oligotrophic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 33, p. 377-387, 1979.

LAVORENTI, A. Comportamento dos herbicidas no meio ambiente. In: WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, 1996, Campinas. *Anais...* Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1996. p. 81-115. (Embrapa-CNPMA, Documentos, 5).

McGILL, W. B.; CANNON, K. R.; ROBERTSON, J. A.; COOK, F. D. Dynamics of soil microbial biomass and water soluble organic C in Breton L. after 50 years of cropping to two rotations. *Canadian Journal of Soil Science*, v. 66, p. 1-9, 1986.

MIKELL, A. T.; SMITH, C. L.; RICHARDSON, J. C. Evaluation of media and techniques to enumerate heterotrophic microbes from karst and sand aquifer springs. *Microbial Ecology*, v. 31, p. 115-124, 1996.

MONTGOMERY, H. J.; MONREAL, C. M.; YOUNG, J. C.; SEIFERT, K. A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, p. 1207-1217, 2000.

NANNIPIERI, P.; GRECCO, S.; CECCANTI, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: BOLLAG, J. M., STOTZKI, G. (Ed.). *Soil biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1990. v. 6, p. 293-355.

NEILSON, A. H. *Organic chemicals: an environmental perspective*. Boca Raton: Lewis Publishers, 2000. 870p.

NEWELL, S. Y. Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. In: CAROLL, G. G.; WICKLOW, D. T. (Ed.). *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 521-561.

NEWELL, S. Y. Minimizing ergosterol loss during pre-analysis handling and shipping of samples of plant litter. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 2794-2797, 1995.

NEWELL, S. Y.; MILLER, J. D.; FALLON, R. D. Ergosterol content of saltmarsh fungi: effect of growth conditions and mycelia age. *Mycologia*, v. 79, p. 688-695, 1987.

OLSON, B. M.; LINDWALL, C. W. Soil microbial activity under chemical fallow conditions: effects of 2,4-D and glyphosate. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 23, p. 1071-1075, 1991.

PIGNATELLO, J. J.; HUANG, L. Sorptive reversibility of atrazine and metolachlor residues in field soil samples. *Journal of Environmental Quality*, v. 20, n. 1, p. 222-228, 1991.

RAO, P. S. C.; DAVIDSON, J. M. Estimation of pesticides retention and transformation parameters required in nonpoint source pollution models. In: OVERCASH, M. R.; DAVIDSON, J. M.; ARBOR, A. (Ed.). *Environmental impact of nonpoint source pollution*. Ann Arbor: Ann Arbor Science, 1980. p. 23-67.

RIIS, V.; LORBEER, H.; BABEL, W. Extraction of microorganisms from soil: evaluation of the efficiency by counting methods and activity measurements. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, n. 12, p. 1573-1581, 1998.

RUZICKA, S.; EDGERTON, D.; NORMAN, M.; HILL, T. The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 232, p. 989-1005, 2000.

SCHÄFFER, A. Pesticide effects on enzyme activities in the soil ecosystem. In: BOLLAG, J. M.; STOTZKY, G. (Ed.). *Soil biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1993. v. 8, p. 273-340.

SCHOEDER, J.; BANKS, P. A. Persistence of norflurazon in five Georgia soils. *Weed Science*, v. 34, p. 595-599, 1986.

SMITH L. J.; PAPENDICK, R. I.; BEZDICEK, D. F.; LYNCH, J. M. Soil organic matter dynamics and crop residue management. In.: METTING, B. (Ed.). *Soil Microbial Ecology*. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 65-95.

SOULAS, G.; CODDACCIONI, P.; FOURNIER, J. C. Effect of cross-treatment on the subsequent breakdown of 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid), MCPA and 2,4,5-T (trichlorophenoxyacetic acid) in the soil. Behaviour of the degrading microbial populations (herbicides). *Chemosphere*, v. 12, p. 1101-1106, 1983.

SPAIN, J. C.; PRITCHARD, P. H.; BOURQUIN, A. W. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 40, p. 726-734, 1980.

STAHL, P. D.; PARKINS, T. B. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 28, p. 847-855, 1996.

THOMPSON, I. P.; BAILEY, M. J.; ELLIS, R. J.; MAGUIRE, N.; MEHARG, A. A. Response of soil microbial communities to single and multiple doses of on organic pollutant. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 31, p. 95-105, 1999.

VIEIRA, R. F. Parâmetros microbiológicos indicadores do efeito do diuron sobre a microflora do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, p. 897-902, 1999.

VIEIRA, R. F.; SILVA, C. M. M. S.; MAIA, A. H. N.; FAY, E. F. An appraisal of five methods for the measurement of the fungal population in soil treated with chlorothalonil. *Pest Management Science*, v. 56, p. 431-440, 2000.

WALLANDER, H.; MASSICOTTE, H. B.; NYLUND, J. E. Seasonal variation in protein, ergosterol and chitin in five morphotypes of *Pinus sylvestris* L. ectomycorrhizae in a mature Swedish forest. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, p. 45-53, 1997.

WAUCHOPE, R. D.; BUTTLER, T. M.; HORNSBY, A. G.; AUGUSTJIN-BECKERS, P. W. M.; BURT, J. P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 123, p. 1-164, 1991.

WEBER, J. B. Properties and behavior of pesticides in soil. In: HONEYCUTT, R. C.; SCHABACKER, D. J. (Ed.). *Mechanisms of pesticide movement into groundwater*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. p. 15-41.

WEETE, J. D. Structure and function of sterols in fungi. *Advances in Lipid Research*, v. 23, p. 115-167, 1989.

YARDEN, O.; KATAN, J.; AHARONSON, N.; BEM-YEPHET, Y. Delayed and enhanced degradation of benomyl and carbendazim in desinfested and fungicide treated soil. *Phytopathology*, v.75, p. 763-767, 1985.

YING, G. G.; WILLIAMS, B. Dissipation of herbicides in soil and grapes in a South Australian vineyard. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 78, p. 283-289, 2000.

Efeito de Paclobutrazol na Microbiota do Filoplano de Mangueiras

Raquel Ghini

A aplicação de agroquímicos no agroecossistema pode resultar em diversos efeitos sobre as comunidades de microrganismos do filoplano, do solo e da água, além de alterações, tanto no metabolismo, como na fisiologia das plantas (Rodríguez-Kabana & Curl, 1980). De modo geral, são poucas as informações sobre os efeitos de agroquímicos sobre organismos não-alvo. Como resultado de uma aplicação, pode haver o estímulo ou a inibição de populações, sendo que ambas podem ser indesejáveis (Bollen, 1985). Tal preocupação não se restringe aos produtos químicos, mas também aos de origem biológica, cuja quantidade de informação, de modo geral, é menor, mas não menos necessária.

A utilização de técnicas de indução floral permite a produção de mangas durante o ano todo na região tropical semi-árida do Brasil (Albuquerque et al., 1997). Dos métodos, o uso de indutores químicos, como o paclobutrazol (PBZ), apresenta-se como um dos mais promissores. O paclobutrazol, derivado dos triazóis, reduz o crescimento vegetativo, promove os processos de floração e frutificação da planta, regulando a alternância da produção de muitas variedades de manga (Ferrari & Sergent, 1996). Por se tratar de um triazol, o produto pode ter efeitos na microbiota do filoplano da mangueira, alterando o seu equilíbrio. Assim sendo, é necessário o estudo dos impactos não visados no agroecossistema decorrente da aplicação do PBZ.

O conhecimento da interação dos fatores que afetam a microbiota, após a aplicação de agroquímicos, pode levar a uma abordagem integrada, através do estímulo do controle biológico natural, resultando em menores custos financeiros e ambientais.

Agroquímicos e seus efeitos na microbiota do filoplano

A superfície foliar é um habitat complexo, no qual, sob condições normais, comunidades de microrganismos permanecem num balanço dinâmico, através de interações entre as populações do filoplano e a planta hospedeira (Baker & Cook, 1974). O delicado balanço, que define a ocorrência dos microrganismos, composição de espécies e a atividade na superfície foliar, pode ser significativamente modificado após a aplicação de um agroquímico. Os microrganismos do filoplano, por causa de sua localização, são facilmente atingidos, por aplicações na parte aérea da planta, alterando o equilíbrio inicial e permitindo a colonização pelos microrganismos do ar ou propágulos que sobrevivem ao tratamento químico. Sob essas circunstâncias, para um microrganismo recolonizar a folha tratada, ele deve possuir, entre outras características, menor sensibilidade a pelo menos baixas concentrações do produto (Hislop, 1976). O mesmo pode ocorrer com produtos aplicados via solo, cuja translocação para as folhas pode acabar resultando em alterações no filoplano.

Na natureza, de modo geral, as populações se desenvolvem de forma dependente, sendo que os diversos membros das comunidades são significativamente afetados por seus vizinhos. As doenças de plantas, entre outros fatores, são resultantes de alterações no equilíbrio da microbiota em favor dos microrganismos fitopatogênicos e redução dos antagonistas (Dickinson, 1973). Assim sendo, quanto maior for a dependência entre o patógeno e o microrganismo não-alvo, maiores serão os efeitos quando um dos associados for atingido pelo produto. Tratamentos que seletivamente inibem microrganismos antagonistas tendem a aumentar a abundância do patógeno no ambiente e, dessa forma, a incidência da doença. Um dos efeitos colaterais indesejados da aplicação de agroquímicos inclui o desenvolvimento de novas

doenças ou, mais freqüentemente, a exacerbação de doenças já presentes, que consistem nas doenças iatrogênicas. Essas podem ser divididas em três grupos, de acordo com o efeito do produto: na planta hospedeira, no patógeno ou no ecossistema (Vyas, 1988).

O filoplano é composto por microrganismos residentes, que crescem na superfície foliar, ou casuais, que foram aí depositados por insetos, pelo vento e outros. A tentativa de penetração na folha por microrganismos, geralmente não patogênicos, que estão continuamente sendo depositados pode resultar na indução de resistência da planta a diversos patógenos. Esses microrganismos podem ainda utilizar os alimentos e os espaços existentes na folha, bem como produzir substâncias inibidoras de germinação e do crescimento de patógenos (Andrews & Kenerley, 1978; Preece & Dickinson, 1971). A eliminação desses microrganismos resulta na redução do controle biológico natural obtido com a indução de resistência, competição, hiperparasitismo e antibiose (Fokkema & Nooij, 1981; Warren, 1974; Ghini, 1991).

Quando comparados com outros microrganismos, os patógenos podem ser considerados fracos competidores por nutrientes. Porém, eles escapam dessa competição quando infectam plantas. Apesar disso, os patógenos estão sujeitos às influências dos saprófitas durante algumas etapas do seu ciclo de vida, pelo menos, durante a germinação de esporos, no início do processo de infecção e, especialmente, durante a sobrevivência na ausência do hospedeiro (Bainbridge & Dickinson, 1972).

Os produtos podem alterar a microbiota diretamente, afetando os seus indivíduos em particular, ou indiretamente, alterando a fisiologia da planta hospedeira (Bollen, 1985). Nos centros de origem, as plantas evoluíram em associação com uma microbiota benéfica, que protege a planta do ataque dos patógenos. Por sua vez, a planta estimula o desenvolvimento dos microrganismos benéficos por meio dos lixiviados de açúcares, aminoácidos e sais minerais. Entre outros fatores, a aplicação de agroquímicos pode tanto ocasionar alterações nos compostos lixiviados, como reduzir as populações epífitas, levando a um desequilíbrio da microbiota associada às plantas (Tokeshi, 1991).

Paclobutrazol e seus efeitos na microbiota do filoplano

O paclobutrazol (PBZ) é um triazol regulador do crescimento de plantas, que inibe o alongamento do caule por meio da inibição da produção de giberelina. Além de limitar o alongamento do caule, o PBZ aumenta a relação raiz: brotações, presumivelmente devido à translocação de produtos da fotossíntese da parte aérea para as raízes.

Devido a tal efeito, o PBZ foi testado para o controle de declínio de árvores em áreas urbanas (Jacobs & Berg, 2000). A aplicação em carvalhos (*Quercus* spp.), por exemplo, estimulou o sistema radicular e promoveu a retomada do crescimento das árvores. Os efeitos benéficos de um único tratamento ainda foram observados alguns anos após a aplicação. Como os fungos frequentemente são os causadores do declínio em árvores, suspeitou-se que o PBZ estivesse também atuando no patógeno, devido às suas características antifúngicas. O PBZ apresenta grande similaridade estrutural com os fungicidas do grupo dos triazóis, que são usados no controle de um amplo espectro de fitopatógenos (Kimati et al., 1997).

Em testes realizados *in vitro*, Jacobs & Berg (2000) verificaram que o PBZ reduziu significativamente o crescimento micelial de fungos causadores de doenças em árvores (cancro, podridão de raízes e murchas), sendo a redução em magnitudes variáveis conforme a espécie. De modo geral, o produto causou redução na germinação de conídios da maioria dos fungos testados. Segundo os autores, a sensibilidade pode estar relacionada com a produção de giberelina pelos fungos, ou talvez outros compostos como ergosteróis que são gerados pela mesma via metabólica das giberelinas. Diversos fungos, particularmente ascomicetos, produzem giberelinas. Entretanto, os autores questionam a relevância dos estudos realizados em laboratório, em relação às condições de campo.

Em testes realizados *in vitro* e *in vivo*, Burpee et al. (1996) avaliaram os efeitos de reguladores de crescimento (PBZ, flurprimidol e trinexapac-ethyl) na ocorrência e severidade da doença *dollar spot*, causada por *Sclerotinia homeocarpa*, em gramados. Os valores de DL_{90} nos ensaios *in vitro* demonstraram serem menores para PBZ e

flurprimidol (0,82 e 2,96 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), do que para trinexapac-ethyl (29,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Porém, foi demonstrado que o efeito é fungistático e não fungicida, já que os discos de meio de cultura contendo micélio do patógeno, após contato com os produtos nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, deram origem a colônias na ausência dos reguladores. Nos ensaios em condições de campo, o PBZ e o flurprimidol reduziram a severidade da doença, enquanto que o trinexapac-ethyl não teve efeito significativo. Os tratamentos com os reguladores de crescimento aumentaram a eficácia do tratamento com fungicidas. Segundo Burpee et al. (1996), os resultados estão relacionados com as características químicas dos produtos. O PBZ (triazol) e o flurprimidol (pirimidina) são quimicamente relacionados com fungicidas DMIs (inibidores da demetilação). O controle da doença provavelmente é resultado da atividade fungistática e das alterações resultantes da inibição do crescimento da parte aérea da planta, alterando o microclima do sítio de infecção do patógeno.

Efeito de paclobutrazol na microbiota do filoplano de mangueiras

Com a finalidade de verificar o efeito de paclobutrazol em microrganismos do filoplano da mangueira, foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo*.

In vitro, foi testado o efeito de PBZ em uma bactéria antagonista (*Bacillus subtilis* isolado AP-3, reconhecidamente antagonístico a diversos fitopatógenos (Bettiol & Kimati, 1990)), uma bactéria fitopatogênica (*Pseudomonas* sp.), um fungo fitopatogênico (*Botrytis cinerea*), três fungos antagonistas (*Trichoderma* sp., *Gliocladium roseum*, *Penicillium* sp.), e cinco leveduras (três linhagens de *Pichia guilliermondii*, uma linhagem de *Rhodotorula mucilaginosa*, e uma de *Sporobolomyces roseus*). Para tanto, suspensões dos microrganismos testados foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura de BDA (batata-dextrose-ágar), e homogeneizadas com auxílio de alça de Drigalski. Discos de papel para antibiograma com diâmetro de 12,7mm foram autoclavados e tratados com soluções de PBZ, nas concentrações de 0; 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O tratamento dos discos consistiu

na imersão nas soluções por 15min. A seguir, os discos foram colocados sobre uma placa para eliminar o excesso de líquido e foram colocados nas placas, contendo os microrganismos, na quantidade de 4 discos/placa de Petri. A incubação foi realizada a 25°C até a avaliação, que consistiu na medição de halos de inibição ao redor dos discos de papel, em dois diâmetros perpendiculares.

Não foi observada a formação de halos de inibição de PBZ, demonstrando que, nas concentrações testadas, o produto não tem efeito sobre os microrganismos testados (Figura 1). Diversos métodos podem ser utilizados para a avaliação dos efeitos de agroquímicos na microbiota do filoplano (Bitton & Dutka, 1986; Dutka & Bitton, 1986; Alef & Nannipieri, 1995), sendo que o método utilizado avalia o efeito direto do produto sobre o microrganismo. Para Hislop & Cox (1969), os testes realizados *in vitro* só devem ser considerados se resultados semelhantes forem obtidos *in vivo*, demonstrando haver correlação entre os dois métodos. Por esse motivo, foram realizados também testes *in vivo*.

Foto: Raquel Ghini

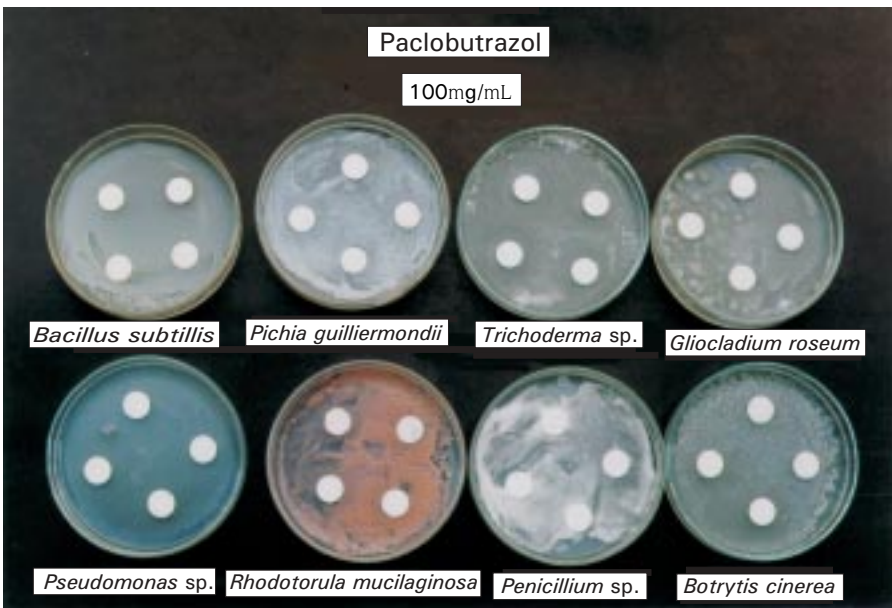


Figura1. Teste in vitro de inibição de microrganismos por paclobutrazol (100µg mL⁻¹).

No ensaio *in vivo*, mangueiras da variedade Haden, cultivadas em vasos mantidos em casa-de-vegetação, foram tratadas com paclobutrazol (0,5g diluídos em 200mL), sendo o produto aplicado no solo. Como testemunha, foi aplicada água destilada nas plantas, no lugar do produto. Foram utilizadas 10 plantas enxertadas para cada tratamento. Em metade das repetições, foram retiradas três folhas novas e, na outra metade, três folhas velhas, após 1, 7 e 30 dias da aplicação do paclobutrazol.

O método de contagem de colônias em meio de cultura seletivo, após diluições sucessivas, foi utilizado para o monitoramento das comunidades de fungos (meio de Martin) e bactérias (meio de Nutriente Ágar acrescido de nistatina - 42mg L^{-1}). De cada amostra foram retirados 20 discos foliares (1cm de diâmetro), os quais foram colocados em 100mL de água destilada esterilizada, juntamente com uma gota de Tween 20L^{-1} de água. A seguir, para a obtenção de uma suspensão contendo os microrganismos do filoplano, o material foi submetido a ultrassom por 1min. e agitador (180rpm) por mais 10min. Aliquotas de 0,1mL das suspensões obtidas foram transferidas para os meios seletivos. Foram utilizadas as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , para a determinação dos fungos e, para a comunidade de bactérias, foram usadas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . A incubação foi realizada a 25°C , com luminosidade ambiente. Após 7 dias, a avaliação foi feita pela contagem do número de colônias desenvolvidas nos meios de cultura.

Os resultados demonstraram que o tratamento com paclobutrazol não alterou as comunidades de fungos (Figura 2) e bactérias (Figura 3). Porém, a metodologia utilizada não avalia alterações na composição das espécies de fungos e bactérias, que pode ter sido alterada pelo tratamento (Elmholt & Smedegaard-Petersen, 1988). Cal & Melgarejo (1988) verificaram que a comunidade de fungos do filoplano de pessegueiros foi qualitativamente alterada após tratamento com fungicidas. Pandey & Kumar (1988) verificaram que houve uma redução da comunidade de fungos e da biodiversidade com a aplicação de fungicidas na cultura da soja, porém a longo prazo houve o desaparecimento de tal efeito.

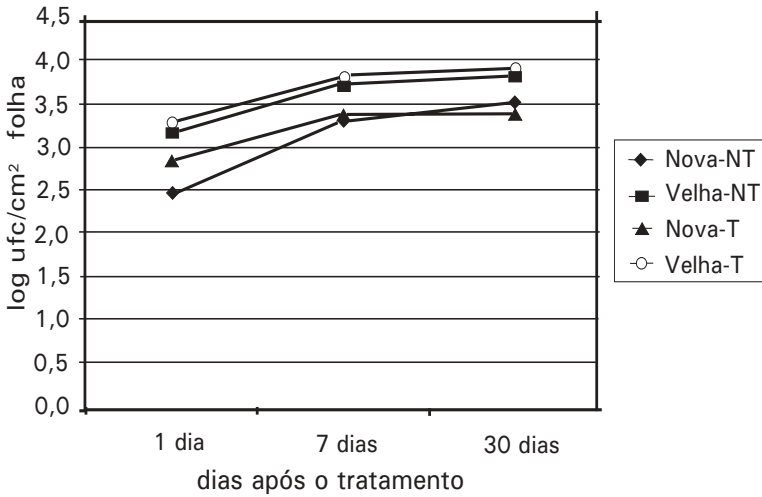


Figura 2. Comunidade total de fungos do filoplano de folhas novas ou velhas de mangueiras da cultivar Haden, após 1, 7 e 30 dias do tratamento (T) ou não (NT) com paclobutrazol.

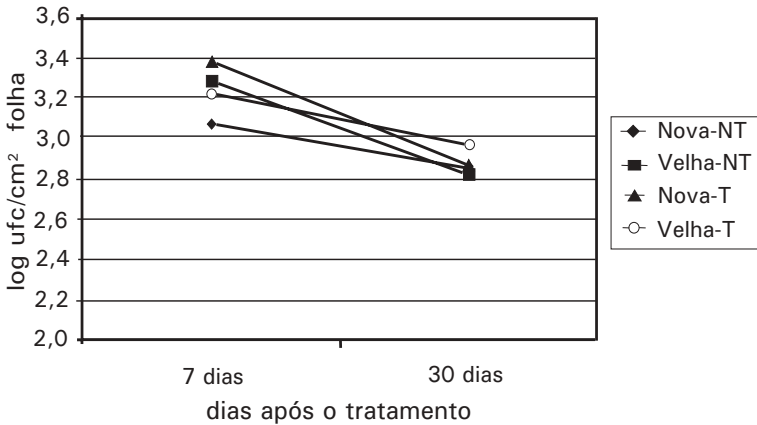


Figura 3. Comunidade total de bactérias do filoplano de folhas novas ou velhas de mangueiras da cultivar Haden, após 7 e 30 dias do tratamento (T) ou não (NT) com paclobutrazol.

Quadro 3.1. Definições

Antagonista: doença de planta é definida como uma íntima interação entre o patógeno e a planta hospedeira influenciada pelo ambiente. Porém, no contexto do controle biológico, doença de planta é o resultado de uma interação entre o hospedeiro, o patógeno e diversos organismos não patogênicos que também habitam o sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Esses organismos são denominados antagonistas (Cook & Baker, 1983; Cook, 1985; Bettiol & Ghini, 1995).

Filoplano: região ou ambiente sobre a superfície foliar (Last & Deighton, 1965).

Fitopatógeno : as doenças de plantas consistem na íntima interação entre dois organismos, ou seja, a planta, que recebe a denominação de hospedeiro e o agente causal, chamado patógeno. Dessa interação resultam as doenças infecciosas ou, também denominadas bióticas. Os patógenos são constituídos por microrganismos como fungos, bactérias, riquétsias, micoplasmas, protozoários, vírus e viróides. O fitopatógeno coloniza os tecidos da planta hospedeira, retirando nutrientes para o seu desenvolvimento, caracterizando um processo de parasitismo (Krügner, 1995).

Microbiota: comunidade de microrganismos presente num determinado habitat.

Saprófitas : microrganismos que se alimentam de células mortas ou matéria orgânica em decomposição.

Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, J. A. S., MOUCO, M. A., REIS, V. C. Floração da mangueira através do uso de reguladores de crescimento. *Instruções Técnicas da Embrapa Semi-Árido*, n. 1, Petrolina, 1997.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. 576 p.

ANDREWS J. H.; KENERLEY, C. M. The effects of a pesticide program on non-target epiphytic microbial populations of apple leaves. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 24, p. 1058-1072, 1978.

BAINBRIDGE, A.; DICKINSON, C. H. Effect of fungicides on the microflora of potato leaves. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v. 59, n. 1, p. 31-41, 1972.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. *Biological control of plant pathogens*. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433 p.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico de doenças de plantas. In: BERGAMIN, A.; KIMATI, H; AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia*, São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, v. 1, p. 717-728, 1995.

BETTIOL, W., KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 25, n. 8, p. 1165-1174, 1990.

BITTON, G.; DUTKA, B. J. *Toxicity testing using microorganisms*. Boca Raton: CRC Press, 1986. v. 1, 163 p.

BOLLEN, G. J. Non-target effects of pesticides on soil-borne pathogens. *Les Colloques de l'INRA*. Versailles, n. 34, p. 11-26, 1985.

BURPEE, L. L.; GREEN, D. E.; STEPHENS, S. L. Interactive effects of plant growth regulators and fungicides on epidemics of dollar spot in creeping bentgrass. *Plant Disease*, v. 80, p. 1245-1250, 1996.

CAL, A. de; MELGAREJO, P. Impact of pesticides on non-target fungi of peach twigs. *Brighton Crop Protection Conference*. Croydon, v. 2, p. 733-738, 1988.

COOK, R. J. Biological control of the pathogens: theory to application. *Phytopathology*, v. 75, p. 25-29, 1985.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul: APS, 1983. 539 p.

DICKINSON, C. H. Effects of ethirimol and zineb on phylloplane microflora of barley. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v. 60, n. 3, p. 423-431, 1973.

DUTKA, B. J.; BITTON, G. *Toxicity testing using microorganisms*. Boca Raton: CRC Press, 1986. v. 2, 202 p.

ELMHOLT, S.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V. Side effects of field applications of propiconazol and captafol on the composition of non-target soil fungi in spring barley. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 123, p. 79-88, 1988.

FERRARI, D. F.; SERGENT, E. A. Control químico del crecimiento vegetativo del mango (*Mangifera indica* L.) cv. Harden, mediante aplicaciones de paclobutrazol. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* Alcance, v. 50, p. 81-88, 1996.

FOKKEMA, N. J.; NOOIJ, M. P. de. The effect of fungicides on the microbial balance in the phyllosphere. *EPPO Bulletin*, Oxford, v. 11, n. 3, p. 303-310, 1981.

GHINI, R. Integração do controle biológico com outros métodos de controle doenças de plantas. In: BETTIOL, W., (Ed.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPDA. 1991. p. 201-217.

HISLOP, E. C. Some effects of fungicide and other agrochemicals on the microbiology of the aerial surface of plants. In: DICKINSON, C. H.; PREECE, T. F., (Ed.). *Microbiology of aerial plant surfaces*. London: Academic Press. 1976. p. 41-74.

HISLOP, E. C.; COX, T. W. Effects of captan on the non-parasitic microflora of apple leaves. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v. 52, n. 2, p. 223-235, 1969.

JACOBS, A. K.; BERG, L. C. Inhibition of fungal pathogens of woody plants by the plant growth regulator paclobutrazol. *Pest Management Science*, v. 56, p. 407-412, 2000.

KIMATI, H.; GIMENES FERNANDES, N.; SOAVE, J.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL, W. *Guia de Fungicidas Agrícolas*. 2.ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1997. 225 p.

KRÜGNER, T. L. A natureza da doença. In: BERGAMIN, A.; KIMATI, H; AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia*, São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, v. 1, p. 35-44, 1995.

LAST, F. T.; DEIGHTON, F. C. The non-parasitic microflora on the surface of living leaves. *Transaction of British Mycological Society*, v. 48, p. 83-99, 1965.

PANDEY, R.; KUMAR, V. Effect of short term fungicidal programme on non-target phylloplane fungi of soybean. *Cryptogamite, Mycologie*, Paris, v. 9, n. 4, p. 363-372, 1988.

PREECE, T. F.; DICKINSON, C. H. *Ecology of leaf surface microorganisms*. London: Academic Press, 1971. 640 p.

RODRIGUEZ-KABANA, R.; CURL, E. A. Nontarget effects of pesticides on soilborne pathogens and disease. *Annual Review of Phytopathology*, v. 18, p. 311-332, 1980.

TOKESHI, H. Manejo da microflora epifita no controle de doenças de plantas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 1991, Campinas. *Anais*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 32-62.

VYAS, S. C. *Nontarget effects of agricultural fungicides*. Boca Raton: CRC Press, 1988. 258p.

WARREN, R. C. Differential effects of fungicides on phylloplane fungi isolated from oak. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v. 62, n. 1, p. 215-218, 1974.

4

Efeito do Paclobutrazol sobre a Microbiota do Solo

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva

Rosana Faria Vieira

Elisabeth Francisconi Fay

Cristiane de Souza Oliveira

O solo é um sistema dinâmico em equilíbrio biológico, todavia este equilíbrio é precário, uma vez que distúrbios neste ambiente têm potencial para modificar as populações e atividades microbianas e, conseqüentemente, a fertilidade do solo. A atividade biótica é a força diretora da degradação e conversão de material exógeno da planta e deposições antropogênicas, transformações da matéria orgânica e evolução e manutenção da estrutura do solo. A energia obtida pelos decompositores primários da matéria orgânica suportam a atividade de vários níveis tróficos do solo. Por sua vez, esta atividade tem uma função primária na ciclagem de nutrientes e suporte para a vida vegetal.

A literatura sobre o efeito dos agroquímicos, como os pesticidas, nos organismos e processos do solo é diversa, com trabalhos sobre os efeitos dos compostos em espécies individuais e/ou em populações de organismos e/ou em sistemas biológicos individuais, usando uma grande diversidade de métodos.

É relatado também o efeito dos diferentes tipos de manejo (rotação de culturas, irrigação, suplementação orgânica, aplicação de agroquímicos) que ocorrem nas áreas agrícolas, sobre os processos do solo ou nos maiores grupos de organismos do solo. O efeito dos xenobióticos nestes organismos envolvem experimentos em laboratório, freqüentemente com efeito a curto-prazo após a aplicação de uma única dose do composto. No entanto, no campo,

um ou mais agroquímicos podem ser aplicados repetidamente no mesmo solo por muitos anos, o que pode levar a um aumento na concentração de resíduos destes xenobióticos ou de seus metabólitos. Desta forma, a possibilidade de efeitos danosos sobre a biomassa microbiana ou sua atividade é muito maior (Hart & Brookes, 1996). Estes efeitos estão associados à sucessão nas bactérias e fungos e a cadeia alimentar associada a estes organismos, podendo levar a um decréscimo inicial nas populações afetando desta forma a biodiversidade. A extensão e a duração destas modificações dependerá da intensidade e duração do distúrbio.

Apesar disso, relativamente pouca pesquisa tem sido realizada para determinar o impacto a longo prazo dos xenobióticos em toda a atividade microbiana e processos do solo e, ainda menos esforço tem sido feito para avaliar os efeitos dos reguladores de crescimento vegetal, nestes casos.

Para estudar os processos biológicos no solo, vários parâmetros têm sido usados e devido a dinâmica complexa desta matriz, nenhum parâmetro é totalmente satisfatório. No entanto, eles são indicadores sensíveis e potenciais do estresse do solo e da produtividade (Dick & Gupta, 1994). A diversidade das comunidades microbianas geralmente decresce em resposta ao estresse ambiental ou distúrbio, que interfere no balanço ecológico das interações entre as populações dentro da comunidade (Atlas, 1983). O número limitado de populações sobreviventes tem propriedades específicas com as quais podem permanecer dentro das comunidades perturbadas. Estas populações sobreviventes podem ser consideradas altamente "especializadas", um princípio usado na técnica clássica de enriquecimento de culturas, para isolamento de microrganismos com características específicas.

Efeito do paclobutrazol na microbiota do solo

Com o objetivo de avaliar o efeito do paclobutrazol na microbiota do solo de duas regiões, foram conduzidos dois ensaios: campo e

casa-de-vegetação. Os estudos de campo foram realizados com solo proveniente de Petrolina/PE (Distrito de Irrigação Nilo Coelho), sob cultivo de manga. Paralelamente a estas avaliações de campo, ocorreram as avaliações em casa-de-vegetação, com solos virgens provenientes de áreas adjacentes às de cultivo com manga, de Petrolina/PE e Lins/SP (ambos com textura franco-arenosa e 9,3 e 12,1g dm⁻³ de matéria orgânica, respectivamente), onde foi avaliado o efeito de diferentes doses do paclobutrazol na comunidade microbiana do solo.

a) Avaliação em campo

A técnica de contagem em placa foi utilizada para verificar o efeito do paclobutrazol nas diferentes comunidades microbianas de solos sob cultivo comercial de manga. Amostras periódicas foram coletadas em solos de textura franco arenosa, com 9,3g dm⁻³ de matéria orgânica. O pomar recebeu a primeira aplicação do paclobutrazol em novembro de 1998 na concentração de 8µg i.a. g⁻¹ de solo. O produto foi diluído em água e aplicado na área de projeção da copa à profundidade de 15cm. Para a avaliação dos parâmetros microbiológicos, amostras foram retiradas à profundidade de 0 - 20cm aos 7, 34, 92, e 150 dias após a aplicação do paclobutrazol. Foram amostradas cinco árvores escolhidas ao acaso. Para cada árvore foram retiradas cinco subamostras, homogeneizadas, constituindo uma amostra composta. Desta forma, foram analisadas 5 amostras compostas para cada época mencionada. Como controle, foram selecionadas cinco mangueiras que não receberam a aplicação do regulador de crescimento. Alíquotas destas amostras compostas foram plaqueadas em meios de cultura para o isolamento de fungos, bactérias e actinomicetos cultiváveis, em meios semi-seletivos (fungo, meio de Martin; actinomicetos, ágar amido-caseína; bactérias, meio ágar nutriente) (Tuite, 1969).

Os dados gerados demonstraram o efeito tóxico do paclobutrazol nos microrganismos do solo, sendo que o número de colônias bacterianas, fúngicas e de actinomicetos cultiváveis, apresentaram um decréscimo médio de 58%, 28% e 28%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do paclobutrazol nos microrganismos em áreas sob cultivo de manga. Média de 5 repetições.

Dias de avaliação	Sem paclobutrazol			Com paclobutrazol		
	Bactérias (x10 ⁴)	Fungos (x10 ²)	Actinomicetos (x10 ²)	Bactérias (x10 ⁴)	Fungos (x10 ²)	Actinomicetos (x10 ²)
7	36,4	57,8	44,2	16,2	53,1	35,8
34	36,8	71,6	35,2	14,4	43,4	23,6
92	25,0	33,8	20,4	9,0	25,4	17,1
150	41,4	49,1	31,6	20,8	30,1	17,4

Verificou-se assim que, de forma geral, os microrganismos do solo foram inibidos pela presença do regulador de crescimento. Este efeito adverso pode afetar as atividades microbianas, como por exemplo, a decomposição da matéria orgânica, atividade esta realizada essencialmente pelos fungos do solo. No entanto, outras avaliações fazem-se necessárias para verificar esta influência nos processos funcionais do solo.

b) Avaliação em casa-de-vegetação

Neste caso foram utilizados solos virgens suplementados em laboratório com paclobutrazol. O solo proveniente de Petrolina foi suplementado com 0, 80 e 160µg do ingrediente ativo g⁻¹ de solo, enquanto que o solo proveniente de Lins recebeu 0,8 e 16µg do ingrediente ativo g⁻¹ de solo. A dose mais alta, aplicada em Petrolina, esteve associada ao elevado valor residual do paclobutrazol encontrado nas áreas cultivadas com manga, daqueles solos. Os parâmetros microbiológicos avaliados após 3, 7, 10, 15 e 27 dias de incubação do solo foram: carbono da biomassa microbiana (Cmic), comprimento de hifas vivas e atividade da desidrogenase. Para o conteúdo de ergosterol do solo as avaliações ocorreram aos 0, 3, 15 e 21 dias. A dissipação do paclobutrazol (Quadro 4.1) foi avaliada no fim do período experimental, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Quadro 4.1. *Dissipação do paclobutrazol*

Na avaliação dos resíduos de paclobutrazol, aos solos amostrados (10g) foram adicionados 100mL de metanol 80%. A mistura foi agitada mecanicamente (100rpm) por 24 horas. Após esse período, o extrato foi separado por centrifugação à 8000rpm por 8 minutos. Foi então realizada uma segunda extração do solo, nas mesmas condições que a anterior, apenas considerando o tempo de agitação de 7 horas. Os extratos metanólicos, coletados nas duas extrações, foram combinados e o solvente foi removido, sob vácuo, em rotaevaporador (30-35°C). A fase aquosa resultante teve o pH ajustado para 11 com NaOH 6,5N e, posteriormente extraída três vezes com diclorometano (50mL). Os extratos orgânicos resultantes foram combinados e concentrados para aproximadamente 2-3mL com evaporador rotatório a vácuo (35°C). Foram secos totalmente em corrente de nitrogênio. Os resíduos de paclobutrazol foram redissolvidos em 10mL de hexano P.R. e filtrados em filtro Millipore de 45 m para posterior injeção no cromatógrafo. As soluções finais das amostras, assim como os padrões de paclobutrazol foram analisados por cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo (NPD). As condições analíticas foram: coluna capilar HP 5 (30m X 0,32mm X 0.25 m) sob as seguintes condições de operação: fluxo de hélio na coluna, 5mL min⁻¹; temperatura do detector 250°C, temperatura do forno: rampa de 60°C a 220°C (15min.). As soluções padrões e os extratos das amostras foram injetados em duplicatas. O tempo de retenção médio do paclobutrazol foi de 9,9min. (Ferracini & Silva, 1999).

b. 1.) Carbono da biomassa microbiana (Cmic)

Para esta avaliação foi utilizado o método de extração-fumigação (Vance et al., 1987) (Quadro 4.2).

Este parâmetro não demonstrou o efeito do paclobutrazol na comunidade microbiana do solo. Esse resultado pode estar associado aos fatores edafo-climáticos das regiões áridas e semi-áridas. Nestes ecossistemas as condições extremas de clima são tais que a maioria das espécies de qualquer taxon estará funcionando muito próxima de seus limites de tolerância. Este fato aliado a baixa diversidade afeta a composição da fração funcional da biota do solo, impondo alterações tanto pela seletividade quanto pela alternância de espécies resistentes ao estresse provocado. Portanto, o efeito do paclobutrazol pode ter sido mascarado pela sucessão de microrganismos resistentes àqueles sensíveis ao regulador de crescimento.

Quadro 4.2. Carbono da biomassa microbiana

Cinquenta gramas de solo foram separadas em duas amostras de 25g; uma amostra foi exposta ao clorofórmio por 24h e então submetida a extração com 100mL de K_2SO_4 0,5M. A outra amostra foi imediatamente submetida à extração. O carbono (C) orgânico nos extratos foi determinado por digestão com dicromato de potássio. O conteúdo do C da biomassa microbiana foi calculado usando a seguinte relação:

$$C_{mic} = 2.64.Ec \quad [1]$$

onde Ec é o C orgânico extraído do solo fumigado menos o C orgânico extraído do solo não fumigado.

b.2.) Atividade enzimática da desidrogenase

A atividade enzimática da desidrogenase (Quadro 4.3) foi avaliada segundo a técnica descrita por Alef (1995).

Os resultados obtidos para os solos de Petrolina demonstraram que tanto o tempo de incubação como as concentrações do composto orgânico tiveram um efeito significativo nesta atividade enzimática (Teste de Duncan, $P < 0,05$) (Figura 1). O efeito diferencial das doses somente foi observado no terceiro dia de incubação. Neste período, houve um decréscimo na atividade desta enzima de 23 e 44%, respectivamente, na menor e maior dose do produto. Do décimo dia em diante, embora o composto orgânico ainda demonstrasse um efeito inibitório na atividade da desidrogenase, não mais se observou diferenças entre doses. No décimo, décimo quinto e vigésimo sétimo dias os decréscimos foram, respectivamente, de 38, 12 e 63%. Essa alta inibição na última avaliação pode estar relacionada à associação do efeito negativo do produto a um possível estresse da comunidade microbiana, originada de algum fator edafoclimático ou a persistência do resíduo no solo. A quantidade residual do paclobutrazol encontrada no solo foi de $85\% \pm 3,4$ do aplicado. Ao contrário do observado em Petrolina, nos solos de Lins não foi observado efeito tóxico do paclobutrazol sobre esta atividade. Tal fato pode estar relacionado às diferentes concentrações do

composto orgânico, utilizada nos diferentes solos. Também foi observado que a dissipação do composto foi mais rápida, permanecendo, no final do período experimental, 78% do aplicado.

Quadro 4.3. Atividade enzimática da desidrogenase

Foram pesados 5g de solo, com a umidade proveniente de campo, em tubos testes e misturados com 5mL da solução de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) a 0,3%. Os tubos foram selados e incubados no escuro por 24h a 37°C. Os tubos controles continham somente 5mL de tampão Tris-HCl 100mM, sem o TTC. Decorrido o período de incubação, 20mL de metanol foram adicionados aos tubos, os quais foram agitados por 1min. e, posteriormente, centrifugados a 2000rpm por 10min. O trifetil formazan (TTF), formado pela redução do TTC, foi medido espectrofotometricamente a 485nm contra o branco.

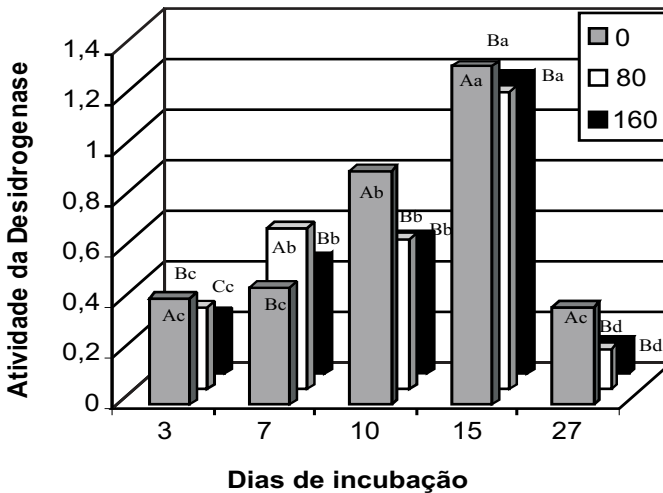


Figura 1. Atividade enzimática da desidrogenase (TPF peso seco⁻¹; µg g⁻¹) em solos coletados em Petrolina, PE e, suplementados em laboratório com diferentes concentrações de paclobutrazol (0, 80 e 160 µg g⁻¹ de solo). Médias seguidas pela mesma letra minúscula e pela mesma letra maiúscula não demonstraram diferenças significativas entre tempo e dentro de cada tempo, respectivamente.

Segundo Rao & Tarafdar (1992), estudos da atividade enzimática da desidrogenase em solos de regiões áridas, demonstraram valores mais altos desta atividade quando as amostragens foram realizadas no período chuvoso. Coincidentemente, o período analisado neste trabalho está no período em que ocorrem as chuvas, no entanto, valores determinados para esta atividade enzimática, por outros autores, em regiões semelhantes, são geralmente mais altos do que os encontrados neste trabalho, demonstrando assim as variações biológicas e bioquímicas existentes em solos de regiões semi-áridas. Além disso, esta atividade é afetada por inúmeros fatores como: tipo de solo, pH, e outros. (Nannipieri, et al., 1990; Beyer, et al., 1992; Pascual et al., 2000). Também, as relações ar-água no solo têm um efeito significativo nesta atividade (Glinski et al., 1986), uma vez que as espécies de organismos ativos nas regiões áridas e semi-áridas são determinadas por fatores abióticos (Whitford, 1989 e 1996). A fração da biota do solo que está ativa em relação a biota total varia consideravelmente no tempo em função do conteúdo de água no solo e temperatura.

b.3.) Conteúdo de ergosterol do solo

Este parâmetro foi utilizado para determinar o efeito deletério do paclobutrazol na comunidade fúngica. O conteúdo de ergosterol do solo (Quadro 4.4) foi avaliado pelo método simplificado proposto por Eash et al. (1996) e os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Quadro 4.4. Conteúdo de ergosterol no solo

Em tubos de centrifuga contendo 5g de solo foram adicionados 15mL de metanol, 5mL de solução de hidróxido de potássio (40g L⁻¹ de KOH a 95% em etanol), homogeneizados em mixer por poucos segundos, e sonificados por 1min. A mistura de extração foi transferida e colocada em banho-maria a 80-83°C por 15min., homogeneizada em mixer, retornando para mais 15min. em banho-maria. Os tubos foram resfriados em água corrente. A mistura de extração foi filtrada em papel Whatman n°1, e lavada com 5mL de água e 10mL de metanol. O filtrado foi transferido para funil de separação de 125mL e extraído com hexano por três vezes (3x10mL). Os extratos foram combinados e concentrados até aproximadamente 2-3mL com evaporador rotatório a vácuo à temperatura de 42-43°C, transferidos para tubos graduados de 10mL, elevados ao volume de aproximadamente 6mL e então levados à secura utilizando-se corrente de N₂. As amostras foram ressuspensas em 4mL de metanol, homogeneizadas e filtradas em filtros HV Millex (0,45 μm). A determinação do ergosterol foi realizada em 4 replicatas para cada dose e em 4 amostras adicionadas do padrão de ergosterol a 0,2 g g⁻¹ de solo (amostra fortificada). As amostras extraídas foram analisadas por CLAE. O sistema consiste de uma bomba Shimadzu LC-10AD e detector UV-VIS SPD-10AV, com o integrador Cromatopac CR7A. O comprimento de onda utilizado foi de 282nm. A coluna C18, de fase reversa, Shim-Pack CLC-ODS (250cm x 4.6mm x 5.0 μm) a temperatura ambiente. A fase móvel foi metanol, com fluxo de 0.8mL min⁻¹. Um "loop" de 20 μl foi usado para a injeção. O tempo de retenção foi de aproximadamente 20min. Os dados obtidos por CLAE foram quantificados pela altura do pico nas amostras e comparados aos padrões da curva de calibração preparadas com ergosterol.

Tabela 2. Estimativa do conteúdo de ergosterol (μg g⁻¹ de solo)* no solo de Petrolina/PE, com diferentes concentrações de paclobutrazol, durante o período experimental. Média de três repetições.

Conc. paclobutrazol g g ⁻¹	Dias			
	0	3	15	21
0	0,1692a	0,3673a	0,1351a	0,1580a
80	0,1692a	0,2597a	0,2033a	0,1908a
160	0,1692a	0,2428a	0,1719a	0,1146a

* A eficiência da extração baseada nas análises de amostras de solo fortificada com ergosterol padronizado foi de 92%. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Duncan, ao nível de 5%.

Tabela 3. Estimativa do conteúdo de ergosterol ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo)* no solo de Lins, SP, com diferentes concentrações de paclobutrazol, durante o período experimental. Média de três repetições.

Conc. paclobutrazol g g^{-1}	Dias			
	0	3	15	21
0	0,1692a	0,5781b	0,5524a	0,4181a
8	0,1692a	0,6110b	0,4966a	0,4890a
16	0,1692a	0,4759a	0,5014a	0,6403b

* A eficiência da extração baseada nas análises de amostras de solo fortificada com ergosterol padronizado foi de 92%. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Duncan, ao nível de 5%.

Pelos resultados apresentados verifica-se que houve um estímulo no crescimento desta comunidade logo após a suplementação do solo, tanto no solo controle quanto nos solos que receberam doses de 80 e $160\mu\text{g g}^{-1}$ do regulador de crescimento. Este estímulo provavelmente é o resultado de maior disponibilidade de carbono. No entanto, a avaliação feita aos 15 dias após a suplementação demonstrou que após este aumento inicial, houve diminuição no conteúdo de ergosterol do solo para ambas as doses, indicando o efeito deletério do composto. Este efeito foi transitório no caso da menor dose, enquanto que na maior dose ele permaneceu mesmo após 21 dias da suplementação. Portanto, esta dose, extremamente elevada e prejudicial demonstra que cuidados devem ser tomados com aplicações repetidas do produto e também a longo prazo.

b.4.) Comprimento de hifa viva

O comprimento de hifas vivas (Quadro 4.5) foi avaliado somente para o solo proveniente de Petrolina. Neste caso foi utilizado o método proposto por Melloni & Cardoso (1999) com algumas adaptações feitas por Nogueira & Cardoso (2000). Observou-se que o efeito inibitório do paclobutrazol ocorreu somente do sétimo dia de incubação em diante, sem diferenças significativas entre doses. O decréscimo médio observado foi de cerca de 79% em relação ao tratamento controle (Figura 2).

Quadro 4.5. Comprimento de hifa viva

Água sob pressão foi adicionada a 20g de solo contidos em um becker de 500mL. A suspensão foi vertida em peneiras de 0,71 e 0,25mm, montadas sobre um funil e um becker de 2 litros. As peneiras foram lavadas com um forte jato de água e a suspensão (1,5 litros) transferida para um liqüidificador, onde foi agitada por 10seg. a baixa velocidade, para garantir a dispersão dos agregados. A mistura permaneceu em repouso por 2min. antes de ser lentamente vertida em uma peneira de 44mesh. O material retido nesta peneira foi suspenso em tampão fosfato (pH 7,4; KH_2PO_4 0,1M + NaOH 0,1M; 10mL). Para a determinação do comprimento de hifas vivas, 5mL dessa suspensão foi misturada com 5mL da solução de diacetato de fluoresceína (FDA) (Bloem et al., 1995). O FDA (5mg) foi dissolvido em 2mL de acetona (Nogueira & Cardoso, 2000). Após incubação à temperatura ambiente por 5min. as hifas foram colhidas por filtração em um filtro Millipore quadriculado (0,45 m). O comprimento das hifas fluorescentes foi determinado utilizando-se luz ultra-violeta emitida em microscópio epifluorescente. Para esse comprimento de onda utilizou-se um filtro azul. O comprimento das hifas foi quantificado em 64 quadradros delineados no centro do filtro, com magnificação de 60X. O comprimento de hifas vivas foi calculado de acordo com a equação de Newman (Newman, 1966).

$$R = (\text{A.n})/2.H \quad [2]$$

onde: R é o comprimento do micélio extraradicular avaliado nos 64 campos do filtro Millipore (mm); A é a área do filtro; n é o número de intersecções das hifas sobre as linhas horizontais do *gride* reticulado da ocular; H é o comprimento total das linhas horizontais do *gride*.

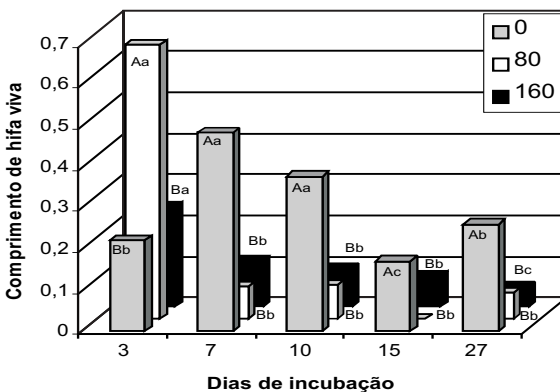


Figura 2. Comprimento de hifa viva (m g^{-1} solo) em solo proveniente de Petrolina, Pernambuco, suplementado com diferentes doses de paclobutrazol (0, 80 e $160 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Médias seguidas da mesma letra minúscula e pela mesma letra maiúscula não diferem significativamente no tempo e dentro de cada tempo, respectivamente.

A aplicação do paclobutrazol ao solo pode interferir na atividade microbiana requerendo observações constantes, quanto ao funcionamento de grupos importantes de microrganismos responsáveis por processos chaves, como a ciclagem de nutrientes. Conforme mostrado pelos resultados, a aplicação deste produto em solos agrícolas pode afetar tanto a atividade enzimática microbiana do solo (como demonstrado pela desidrogenase) como mais especificamente os fungos, evidenciado pela atividade de hifas fúngicas (como demonstrado pelo comprimento de hifas vivas) e conteúdo de ergosterol do solo. Embora a aplicação de paclobutrazol, nas doses recomendadas, tenha mostrado efeitos mínimos nas propriedades biológicas do solo, a sua aplicação sequenciada, ao longo dos anos, deve ser considerada, principalmente em decorrência de sua alta persistência.

Referências Bibliográficas

- ALEF, K. Dehydrogenase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p. 228-231.
- ATLAS, R. M. Diversity of microbial communities. *Advances in Microbial Ecology*, v. 7, p. 1-47, 1983.
- BEYER, L.; WACKENDORF, C.; BALZEN, F. M.; BALZER/GRAF, V. R. The effect of soil texture and soil management on microbial biomass and soil enzyme activities in arable soils of Northwest Germany. *Agrobiological Research*, v. 45, p. 276-283, 1992.
- BLOEM, J.; BOLHUIS, P. R.; VENINGA, M. R.; WIERINGA, J. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In: ALEF, K., NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p. 162-173.
- DICK, R. P.; GUPTA, V. V. S. R. A conceptual model for the role of abiotic soil enzymes in a microbial ecology. A potential analogue for soil quality. In: PANKHURST, C. E.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R.; GRACE, P. R. (Ed.). *Soil biota: management in a sustainable farming systems*. Adelaide: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Information, 1994. p. 167-168.
- EASH, N. S.; STAHL, P. D.; PARKIN, T. B.; KARLEN, D. L. A simplified method for extraction of ergosterol from soil. *Soil Science of Society of American Journal*, v. 60, p. 468-471, 1996.
- FERRACINI, V. L.; SILVA, C. M. M. S. *Validação de métodos para análise de resíduos de paclobutrazol*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999, 3p. (Embrapa Meio Ambiente. Pesquisa em Andamento).
- GLINSKI, J.; STEPNIIEWSKA, Z.; BRZEZINSKA, M. Characterization of the dehydrogenase and catalase activity of the soils of two natural sites with respect to the soil oxigenation status. *Polish Journal of Soil Science*, v. 19, p. 47-52, 1986.

HART, M. R.; BROOKES, P. C. Soil microbial biomass and mineralization of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 12, p. 1641-1649, 1996.

MELLONI, R.; CARDOSO, E. J. B. N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. I. Método empregado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 23, p. 53- 58, 1999.

NANNIPIERI, P.; GRECCO, S.; CECCANTI, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: BOLLAG, J. M.; STOTZKI, G. (Ed.). *Soil biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1990. v. 6, p. 293-355.

NEWMAN, E. I. A method for estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology*, v. 3, p. 139-45, 1966.

NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento de soja em função de doses de fósforo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, p. 329-338, 2000.

PASCUAL, J. A.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; MORENO, J. L.; ROS, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation process. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, p. 1877-1883, 2000.

RAO, A. V.; TARAFDAR, J. C. Seasonal changes in available phosphorus and different enzyme activities in arid soils. *Annals of Arid Zone*, v. 31, p. 185-189, 1992.

TUITE, J. *Plant pathological methods: fungi and bacteria*. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1969, p. 239.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 19, p. 703-707, 1987.

WHITFORD, W. G. The importance of the biodiversity of soil biota in arid ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, v. 5, p. 185-195, 1996.

WHITFORD, W. G. Abiotic controls on the functional structure of soil food webs. *Biology and Fertility of Soils*, v. 8, p. 1-6, 1989.

5

Degradação de Paclobutrazol em Solos Tropicais

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva
Elisabeth Francisconi Fay

De todos os compostos que atingem o solo, os xenobióticos merecem atenção especial, pois seu desaparecimento, persistência ou transformação indicam sua eficácia como produto e seu perigo potencial para a microbiota e a qualidade do ambiente. Muitos problemas de contaminação por xenobióticos estão ligados tanto à falta de conhecimento para o seu uso, como a não observância do meio ao qual ele é aplicado. O problema básico para a maioria dos casos tem sido a falta do entendimento dos processos que afetam o comportamento e o destino dos pesticidas a partir do ponto de entrada no ambiente.

As informações sobre a degradação da maioria dos agroquímicos utilizados na agricultura são raras no Brasil, bem como estudos sobre o impacto desses produtos no ambiente, preocupando em muito os técnicos envolvidos na atividade agrícola, bem como alguns membros da sociedade, no que diz respeito à sustentabilidade da agricultura.

A transformação de xenobióticos envolve uma série potencialmente complexa de interações entre a molécula, populações microbianas e o ambiente. Os microrganismos podem degradar o composto, no entanto, este pode persistir se as condições ambientais forem desfavoráveis para a atividade microbiana, uma vez que as populações são reservatórios de potenciais catalíticos, a partir dos quais diferentes tipos e velocidades de atividade degradativa podem ser expressas.

Relatos sobre a degradação do regulador de crescimento vegetal informam que a sua persistência no ambiente está relacionada ao tipo de solo e às condições climáticas. Segundo Jackson et al. (1996), o paclobutrazol apresentou estabilidade térmica degradando lentamente em todas as temperaturas, sendo que a meia-vida em suspensão aquosa a 25°C foi de 4,5 anos e a 60°C foi de 2,5 anos. Em ambiente aquático, foi observado meia-vida de 24,4 dias, enquanto em solo não houve dissipação até aos 168 dias de amostragem (Chand & Lembi, 1994). Já em solução nutriente, após uma hora da aplicação do paclobutrazol, foram observados valores residuais em torno de 59% do valor inicial aplicado (Adriansen & Ogaard, 1997). Jackson et al. (1996) concluíram que este composto é parcialmente degradado por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Alcaligenes* em cultura pura, sendo o anel clorobenzeno metabolizado mas não o 1,2,4-triazol que é resistente ao ataque microbiano.

Objetivando avaliar a degradação deste regulador de crescimento em solos brasileiros sob cultivo de manga, foi desenvolvido este trabalho considerando duas regiões representativas da cultura da manga no país.

Dissipação do paclobutrazol em solos tropicais

No trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Meio Ambiente, foram utilizados solos com e sem histórico de aplicação do regulador de crescimento provenientes de plantios comerciais de manga para exportação, em Petrolina/PE e Lins/SP. O meio de cultura utilizado para isolamento das culturas mistas degradadoras do composto orgânico em estudo foi (g L^{-1}): K_2HPO_4 , 0.8; KH_2PO_4 , 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; CaSO_4 , 0.1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.001, suplementados com 8 μg paclobutrazol g^{-1} de solo e 0,5% de extrato de levedura. Aos frascos contendo 100mL de meio de cultura foram adicionados 10g de solo seco e incubados à 30°C sob agitação constante (180rpm). Após três dias para o crescimento da biomassa microbiana, foram realizadas três repicagens para selecionar as linhagens degradadoras. Posteriormente, as culturas bacterianas selecionadas foram

avaliadas quanto a sua capacidade degradativa. Para isso, foram utilizados o meio de cultura e as condições de incubação já descritos. A dissipação do regulador de crescimento foi avaliada após 7, 15, 30, 60 e 90 dias de incubação. A determinação quantitativa dos resíduos de paclobutrazol foi conduzida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após filtração das amostras em filtros com malha 0,22mm. As condições cromatográficas foram: fase móvel metanol: água (70:30); fluxo 0,7mL min⁻¹.; detector de absorvância operando a 220nm; coluna C18. Sob estas condições, o tempo de retenção do paclobutrazol foi de aproximadamente 6 minutos. A recuperação do regulador de crescimento vegetal do meio líquido foi de 95%. Os cálculos para a quantificação foram baseados em curvas de calibração obtidas para soluções padrões de paclobutrazol em concentração conhecida.

Os estudos de degradação foram acompanhados da avaliação do crescimento das culturas bacterianas por espectrofotometria, durante 120 horas, nas mesmas condições experimentais.

O paclobutrazol foi usado como fonte de carbono e energia em condições aeróbias e mesofílicas e, entre os microrganismos enriquecidos em meio de cultura, não foi detectada a presença de fungos. Devido ao baixo número de actinomicetos, estes não foram considerados importantes. Portanto, a cultura mista resultante foi composta apenas de diferentes bactérias, as quais foram isoladas, purificadas e caracterizadas por RAPD, cujos resultados estão apresentados no capítulo 6. Por outro lado, uma vez que já é conhecido o efeito inibitório do regulador de crescimento sobre o crescimento fúngico (Deas & Clifford, 1984), não foi surpresa que esses microrganismos não tenham sido enriquecidos pela utilização do composto, resultado também observado por Jackson et al. (1996).

No caso da degradação do paclobutrazol, entre as culturas mistas avaliadas, observou-se que todas demonstraram inibição no crescimento quando na presença do regulador de crescimento (Figura 1). As culturas mais afetadas foram as coletadas em

solos de Lins/SP e em solos de Petrolina/PE com histórico de aplicação de paclobutrazol. Apesar das culturas obtidas em solos sem histórico de aplicação não serem tão afetadas, elas não foram eficientes em degradar o composto orgânico. Em todos os solos estudados a inibição inicial foi superada em \pm 24 horas, indicando a presença de um período de adaptação dos microrganismos ao produto. Após este período de adaptação, a velocidade do metabolismo do composto ainda foi lenta, conforme pode ser verificado na Figura 1. Resultados semelhantes foram obtidos por Jackson et al. (1996), onde a taxa de crescimento de todos os isolados bacterianos foi lenta quando na presença do paclobutrazol, e todas as curvas de crescimento foram diauxicas. Provavelmente, segundo os autores, a possível causa para este tipo de crescimento é a transferência na utilização de um nutriente por outro. O ataque por uma seqüência de enzimas na estrutura do paclobutrazol poderia explicar esta resposta diauxica, uma vez que esta molécula contém diferentes grupos funcionais que variam em conformação estérica, composição atômica e polaridade.

Na degradabilidade do regulador de crescimento, houve diferença entre os quatro solos estudados. De acordo com a Figura 1, o solo com histórico de aplicação do paclobutrazol (solo C) apresentou maior capacidade degradativa (42%), quando coletado na profundidade de 20cm. Este fato pode ser explicado pela própria aplicação do composto, isto é, ele é aplicado à profundidade de 15cm, portanto, microrganismos situados próximos a esta profundidade devem estar mais adaptados ao composto orgânico, utilizando-o como fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Por outro lado, o solo proveniente de Lins/SP apresentou a porcentagem de desaparecimento do produto próximo ao solo com histórico de aplicação de paclobutrazol, demonstrando que neste solo há populações com maior potencial degradativo, mesmo que estas não tenham tido contato anterior com o produto.

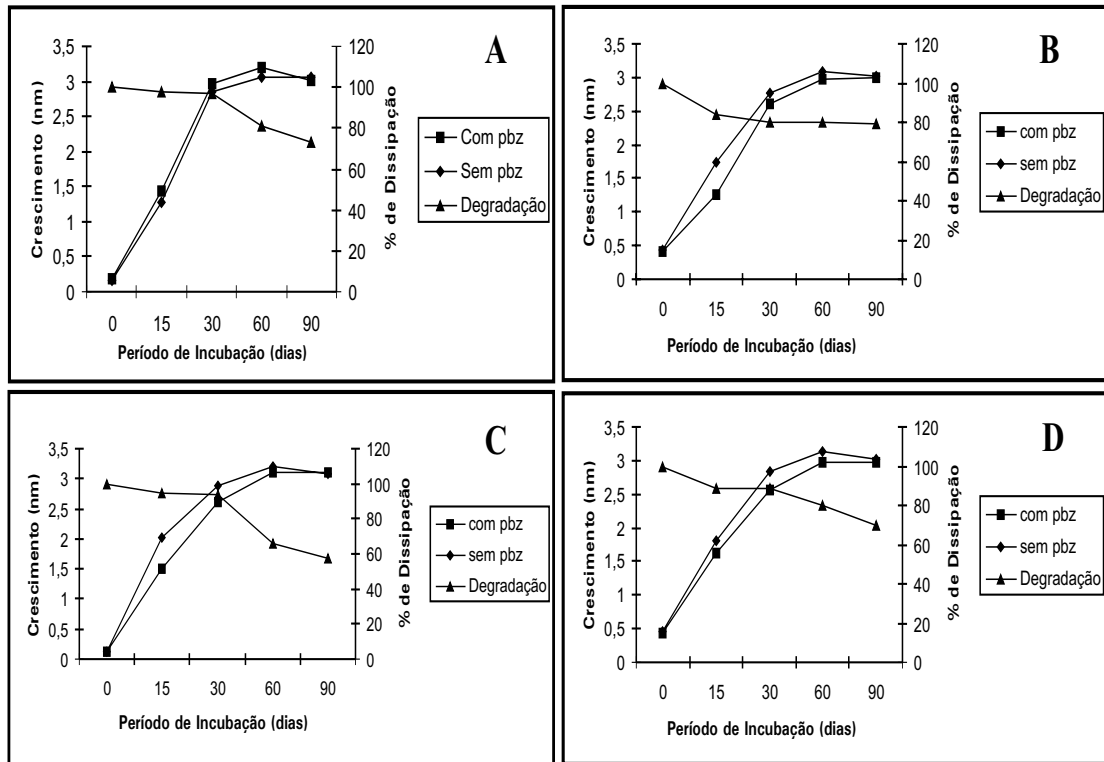


Figura 1. Degradação de paclobutrazol e crescimento bacteriano em: a) solo sem histórico de aplicação de paclobutrazol, coletado à profundidade de 20-40cm; b) solo sem histórico de paclobutrazol, coletado à profundidade de 0-20cm; c) solo com histórico de aplicação de paclobutrazol, coletado à profundidade de 20-40cm; d) solo coletado no município de Lins/SP, sem histórico de aplicação de paclobutrazol.

Referências Bibliográficas

ADRIANSEN, E.; OGAARD, P. Residues of paclobutrazol and uniconazole in nutrient solutions from ebb and flood irrigation of pot plants. *Scientia Horticulturae*, v. 69, n.1-2, p. 73-83, 1997.

CHAND, T.; LEMBI, C. A. Dissipation of gibberelin synthesis inhibitors in small-scale aquatic systems. *Journal of Aquatic Plant Management*, v. 32, p.15-20, 1994.

DEAS, A. H. B.; CLIFFORD, D. R. Reductive and oxidative metabolism of triazolymethanes by two basidiomycete fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.22, p. 276-284, 1984.

JACKSON, M. J.; LINE, M. A.; HASAN, O. Microbial degradation of a recalcitrant plant growth retardant-paclobutrazol (PP333). *Soil Biology and Biochemistry*, v. 28, n. 9, p. 1265-1267, 1996.

JANKE, D.; FRITCHE, W. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *Journal of Basic Microbiology*, v.23, p. 603-619, 1985.

6

Análise do Polimorfismo de Bactérias Degradadoras de Paclobutrazol

Andrea Maria Spessoto

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva

Cristiane de Souza Oliveira

Wellington Luiz de Araújo

Em estudos de impacto ambiental envolvendo pesticidas, existe uma grande preocupação em detectar e caracterizar microrganismos capazes de utilizar estas moléculas como fonte de energia, conhecer as vias metabólicas envolvidas no processo, bem como sua possível utilização em processos de biorremediação de ambientes.

Métodos baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) têm gerado dados para identificação e enumeração de microrganismos em amostras ambientais. Trata-se de um método enzimático, introduzido por Saiki et al. (1985), que resulta em rápida e eficiente amplificação de uma seqüência específica do DNA ou RNA. A reação de PCR envolve três etapas: 1) a desnaturação do DNA-alvo; 2) o anelamento de oligonucleotídeos (*primers* que flanqueiam o DNA alvo) utilizados como iniciadores, e 3) o alongamento das novas fitas de DNA pela enzima Taq DNA polimerase, a partir do terminal 3' do *primer*.

A técnica de PCR tem sido muito utilizada em estudos que envolvem a utilização de microrganismos capazes de atuar em processos de descontaminação de locais altamente poluídos ou áreas com alta descarga de resíduos (Joshi & Wallia, 1996; Khan et al., 1998). Nos últimos anos surgiram variações do método básico de PCR, entre elas REP-PCR, RAPD, DGGE, as quais vêm contribuindo para novas informações em estudos de monitoramento da distribuição de grupos distintos de microrganismos no ambiente.

Na técnica RAPD-PCR (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), a análise de polimorfismo gerado por marcadores de RAPD, promove a amplificação de uma seqüência de DNA por meio da extensão de um *primer*, com seqüência arbitrária (com 6 a 10 nucleotídeos), para a obtenção de produtos de amplificação de diferentes isolados, espécies e gêneros (Williams et al., 1990; Welsh & MacClelland, 1990). Este método é muito útil quando não se tem o conhecimento molecular prévio do organismo e pode ser aplicado para qualquer espécie, desde que o DNA esteja purificado.

O presente trabalho foi realizado para detectar a presença de polimorfismo em bactérias isoladas de solos, capazes de degradar o regulador de crescimento paclobutrazol, utilizando-se primers com 6 a 10 bases e que se anelam arbitrariamente no DNA (RAPD-PCR).

Caracterização genética de bactérias degradadoras de paclobutrazol

Foram obtidos um total de 40 isolados bacterianos provenientes de solos de Petrolina/PE (com e sem histórico de aplicação do paclobutrazol) e de Lins/SP (sem histórico de aplicação), coletados em duas profundidades (0-20cm e 20-40cm), capazes de crescer utilizando o paclobutrazol ($8\mu\text{g}$ de i.a. g^{-1} solo) como fonte de carbono.

Os isolados foram agrupados de acordo com as características morfológicas das colônias e semeados em placas de Petri contendo o meio de cultura MS (ágar 16g; NaNO_3 3g; KH_2PO_4 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; KCl 0,5g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g em 1L de água destilada), suplementado com paclobutrazol ($8\mu\text{g}$ i.a. mL^{-1}). Para a análise de polimorfismo gerado por RAPD, foram escolhidos os grupos com maior número de representantes (GI e GII), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Isolados bacterianos provenientes de solos com e sem aplicação de paclobutrazol, agrupados de acordo com as características morfológicas das colônias.

Grupo	Número de isolados	Textura de colônia	Coloração de colônia
G I	21	mucóide	Branca
G II	19	mucóide	Amarelo claro

Os isolados foram numerados de acordo com local e profundidade de amostragem e histórico de utilização do paclobutrazol, como a seguir:

02 a 07 e 10 até 32 = isolados provenientes do solo de Petrolina/PE, coletados de 0-20cm de profundidade, sem histórico de aplicação do regulador de crescimento;

33 até 64 = isolados provenientes do solo de Petrolina/PE, coletados de 20-40cm de profundidade, sem histórico de aplicação do regulador de crescimento;

08, 09 e do 65 em diante = isolados provenientes também de Petrolina/PE, na profundidade de 0-20cm, com histórico de 3 anos de aplicação de paclobutrazol.

O único isolado pertencente ao solo de Lins/SP, sem histórico de aplicação do paclobutrazol, agrupado no GI, foi identificado pelo número 01.

Lins e L20 = isolados provenientes do solo de Lins/SP, agrupados no GII.

As análises demonstraram a presença de grande diversidade polimórfica entre os isolados degradadores do composto (Figuras 1 e 3). O dendrograma do grupo GI possibilitou mostrar o nível de similaridade genética entre as bactérias (Figura 2). Dentre elas, os isolados 85, 59, 63, 54 e 45 formaram um grupo praticamente

idêntico do ponto de vista genético, com padrões de bandas bem semelhantes. Destes, apenas o isolado 85 pertence ao solo de Petrolina/PE, com histórico de 3 anos de utilização do paclobutrazol e coletado nos primeiros 20cm de profundidade. Os demais isolados (45, 54, 59 e 63), vieram do mesmo solo, porém coletado na profundidade de 20-40cm e sem histórico de pré exposição ao regulador de crescimento.

85 59 63 54 45 60 41 40 37 43 09 39 05 38 49 64 67 08 07 01 82 M

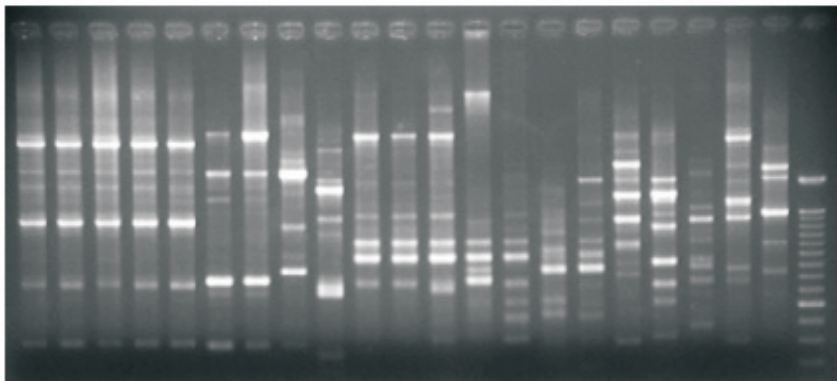


Figura 1. Perfil eletroforético de bactérias degradadoras de paclobutrazol, amplificadas com o *primer* OP19. Os isolados do grupo GI estão indicados pelos números de acordo com o isolamento. O marcador de peso molecular, 100 pares de base (Pharmacia), está indicado pela letra M.

Outros agrupamentos com coeficientes de similaridade igual a 1 foram gerados dentro do GI, como os casos dos isolados 60 e 41; 43, 09 e 39; 49 e 08. No entanto, o seqüenciamento e posterior identificação de alguns isolados revelou a predominância de bactérias pertencentes ao gênero *Stenotrophomonas sp* (45, 59, 85, 60, 09 e 08), não sendo possível correlacionar a profundidade de coleta ou mesmo pré-exposição à molécula do regulador de crescimento com os resultados obtidos.

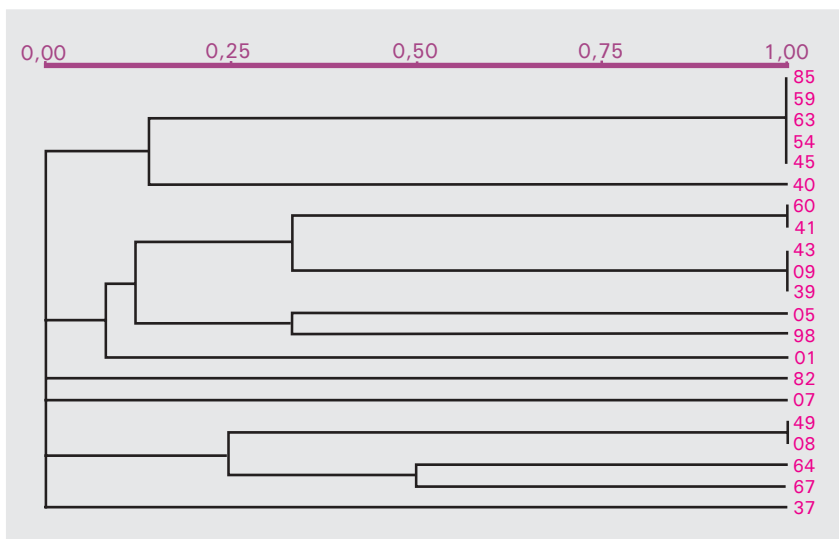


Figura 2. Dendrograma obtido a partir de uma matriz de similaridade genética entre os isolados do GI degradadores de paclobutrazol. Para a construção da matriz foi utilizado o coeficiente Jaccard.

Lins L20 03 06 10 11 12 13 15 20 24 36 01 13 22 58 53 56 31 M

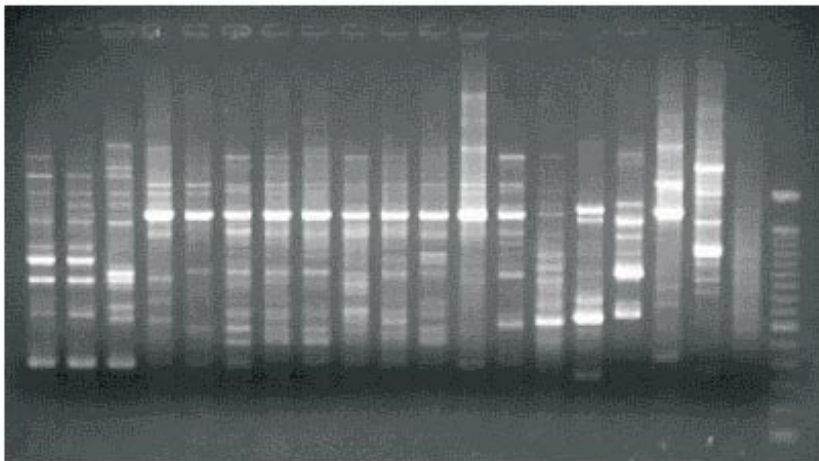


Figura 3. Perfil eletroforético de bactérias degradadoras de paclobutrazol, amplificadas com o *primer* OP20. Os isolados do grupo GII estão indicados pelos números de acordo com o isolamento. O marcador de peso molecular, 100 pares de base (Pharmacia) está indicado pela letra M.

As características do solo, culturas presentes, histórico de aplicação, também parecem ser fatores importantes na “seleção” destas bactérias degradadoras, uma vez que para o grupo GI aproximadamente 95% dos isolados vieram do solo de Petrolina/PE, sendo que destes, 62% foram coletados na profundidade de 20-40cm, em solos sem histórico de utilização do paclobutrazol.

No caso do grupo GII, 68% das bactérias vieram de solos coletados à profundidade de 20-40cm, em Petrolina/PE, sem histórico de aplicação do paclobutrazol, sendo apenas 2 isolados provenientes do solo de Lins, SP. O solo coletado no município de Lins/SP, responsável pela maior produção de mangas no estado de São Paulo, teve poucos representantes capazes de crescer em meio mínimo de cultura, suplementado com paclobutrazol. Os dados sugerem que, fatores como características do solo, microbiota presente e número de exposições ao composto poderiam explicar a baixa frequência de isolamento observada.

Do ponto de vista genético, as análises demonstraram a presença de alguns isolados estreitamente relacionados (Figura 4). Comparando todos os isolados presentes no grupo, o polimorfismo gerado foi expressivo, como no caso do GI.

As bactérias identificadas para o GII pertencem aos gêneros *Bacillus sp* (15, 20, 24) e ao gênero *Brevibacillus sp* (Lins e L20).

No conjunto das análises envolvendo os dois grupos de bactérias degradadoras de paclobutrazol (GI e GII), observou-se que embora as populações apresentem grande polimorfismo, poucos foram os gêneros predominantes. Estes microrganismos, potencialmente interessantes em processos biotecnológicos, também foram isolados principalmente do solo de Petrolina/PE, região onde a molécula tem sido extensivamente utilizada para facilitar manipulação das culturas de manga e reduzir o tempo necessário para sua produção.

Estes dados corroboram com os resultados obtidos para a degradação do composto (ver capítulo 5) e reforçam a importância direta destas populações na dissipação do paclobutrazol no ambiente. Neste sentido, estas bactérias poderiam vir a contribuir em processos de biorremediação de ambientes contaminados com paclobutrazol, embora outros fatores relacionados a viabilidade de sua aplicação devam ser avaliados.

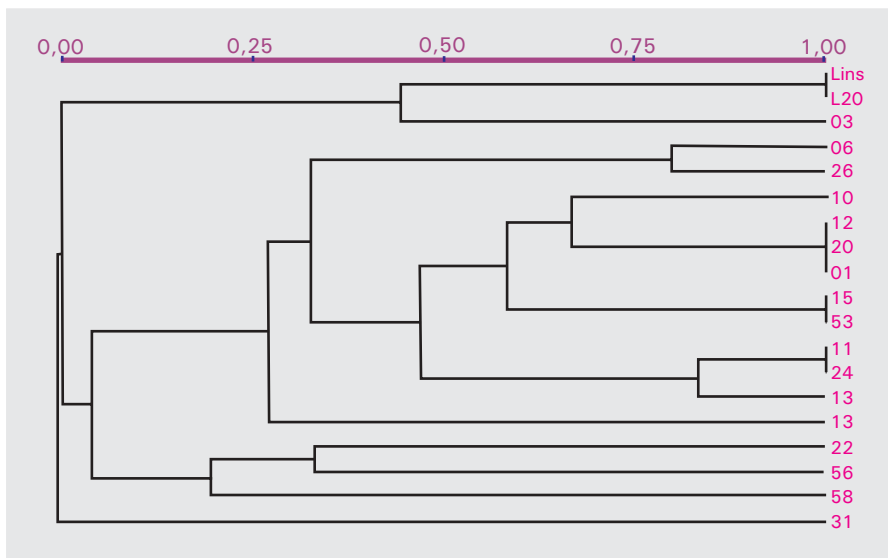


Figura 4. Dendrograma obtido a partir de uma matriz de similaridade genética entre os isolados do GII degradadores de paclobutrazol. Para a construção da matriz foi utilizado o coeficiente Jaccard.

Quadro 5.1**1- Isolamento de microrganismos em meio mínimo de cultura com paclobutrazol**

A técnica utilizada foi a de diluição em série e plaqueamento em meios de cultura contendo o composto na concentração de 8 g ingrediente ativo g⁻¹ de solo.

2- Extração do DNA genômico de bactérias

A metodologia utilizada para extração do DNA genômico total de bactérias foi baseada em Pitcher et al., 1989.

3- Seleção de primers para RAPD

Foi utilizado um kit de primers da Operon Technologies (USA) para RAPD *Fingerprinting*, contendo 20 primers (Oligonucleotídeos com 10 pares de bases). Na Tabela 1 estão apresentados os primers escolhidos para as análises.

Tabela 1. Primers utilizados nas análises de polimorfismo de bactérias degradadoras de paclobutrazol.

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' 3'	Conteúdo de bases C G (%)
OPJ 1	CCCGGCATAA	60
OPJ 19	GGACACCACT	60
OPJ 20	AAGCGGCCTC	70

4- Reação de amplificação

Reagentes	Estoque	Concentração final por reação	Volume para reação de 25 L
Sol Tampão de Taq DNA polimerase	10X	1X	2,5 L
MgCl ₂	50mM	1,25mM	2,4 L
Primers	15 M	1 M	1,5 L
dNTPs	25mM	200 M	0,2 L
Taq DNA polimerase	5U/ L	1,8U	0,36 L
DNA	-	20ng	1,0 L
Água Milli-Q	-	-	q.s.p. 25 L

5- Programa de amplificação

RAPD *fingerprinting* : 1 ciclo de 4min a 92 C; 40 ciclos de 1min a 92 C, 2 min a 37 C, 3min a 72 C; 1 ciclo final de extensão de 3min a 72C e finalizar a 4 C.

6- Gel de agarose 1,4% para RAPD

Agarose 1,4g
Tampão TAE 1X 100mL

7- Marcador de peso molecular

Ladder (0,5 g. L⁻¹) 20 L
TE 50 L

8- Análise dos dados gerados por RAPD

Os dados obtidos por RAPD foram transformados em variáveis binárias, ou seja, o número 1 significou a presença de banda e o número 0 a ausência de banda. Os dados introduzidos no programa NTSYS-PC (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs - Applied Biostatistics, Inc*), geram matrizes de similaridade, utilizando-se o coeficiente de similaridade de JACCARD, calculado de acordo com a fórmula: $J = M/P$; onde M é o número de concordâncias positivas e o P o número total de variáveis, menos concordâncias negativas. Estes dados da matriz de similaridade foram utilizados pelo programa para a construção de dendrogramas pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*).

Referências Bibliográficas

JOSHI, B.; WALIA, S. PCR amplification of catechol 2,3-dioxygenase gene sequences from naturally occurring hydrocarbon degrading bacteria isolated from petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 19, p. 5-15, 1996.

KHAN, A. A.; JONES, R. A.; CERNIGLIA, C. E. Rapid method for detection of genetically engineered micro-organisms by polymerase chain reaction from soil and sediments. *Journal of Industrial, Microbiology and Biotechnology*, v. 20, n. 2, p. 90-94, 1998.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8, p. 151-56, 1989.

SAIKI, R. K.; BUGAWAN, T. L.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A.; ARNHEIN, N. A. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-54, 1985.

WELSH, J.; MacCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

Avaliação de Risco em decorrência da Exposição Perinatal ao Paclobutrazol: análise de alguns indicadores físicos e neurocomportamentais

Vera Lúcia S. S. de Castro

Na maioria das vezes, a neurotoxicidade ocasionada pela exposição a substâncias tóxicas é avaliada de acordo com algumas baterias de testes, descritas na literatura internacional. Contudo, tais baterias variam de acordo com as recomendações e/ou legislação de cada país ou de acordo com critérios estabelecidos pelos pesquisadores envolvidos no trabalho. Essas baterias podem ser realizadas por: (a) aplicação de questionários e exames clínicos complexos (ex: dano de condutividade nervosa periférica) e avaliações comportamentais ou (b) realização de protocolos experimentais que também podem sofrer alterações baseadas nas mesmas justificativas. Desta forma, torna-se importante o estabelecimento de uma avaliação criteriosa e uniforme da neurotoxicidade causada por xenobióticos, valendo-se tanto de modelos experimentais em animais quanto da possível avaliação da extrapolação de seus resultados para o estudo de populações humanas.

O estudo do efeito dos xenobióticos durante a fase de lactação é importante devido a possibilidade de eliminação por esta via e, conseqüentemente, a exposição do lactante ao produto. Nesse caso, o desenvolvimento da criança sofreria alterações pela substância excretada uma vez que no nascimento o organismo ainda possui os sistemas fisiológicos imaturos. A taxa de eliminação dos xenobióticos pelo leite depende da concentração do composto no sangue, da capacidade de difusão desse pelas membranas

celulares, de sua afinidade pelos constituintes do leite e da quantidade a ser eliminada, além da eficiência das vias de desintoxicação e excreção.

As crianças estão também expostas por outras vias tais como a ingestão de água e alimentos, a respiratória, por contato dermal, dentre outros. As diferenças relacionadas à idade podem ocorrer devido a vários fatores incluindo os toxicocinéticos orquestrados pelos processos ontogenéticos.

Alguns dos pontos a serem estudados em avaliação de risco sobre neurotoxicidade são: alterações estruturais (histologia), funcionais (neuroquímica e/ou neurofisiologia), comportamentais (cognição, atividade motora, dentre outras) e neurofisiológicas (condução nervosa). Os testes para avaliar cada um desses parâmetros, por uma relação dose-resposta em animais de laboratório, são utilizados em conjunto com outros dados de literatura e dados epidemiológicos, para a confecção da avaliação de risco. Entretanto, como o resultado de um determinado estudo pode depender de uma variabilidade inerente, é interessante o uso de vários testes complementares.

O gerenciamento do risco deverá levar em consideração a análise de informações e recomendações da fase de avaliação; realidade econômica, social e tecnológica; riscos a saúde e ao ambiente; análise da percepção e aceitação social do risco; e análise dos recursos disponíveis e necessários ao desenvolvimento e planejamento de estratégias de manejo de risco. A partir daí será estabelecido um programa de prevenção e educação da população envolvida e por fim a avaliação dos resultados do programa adotado.

Avaliação de risco à saúde

Apesar da diversidade de estudos existentes, o impacto dos xenobióticos na saúde nem sempre é bem conhecido. Sabe-se por exemplo que a exposição de fêmeas à pesticidas durante a fase reprodutiva pode levar a alterações fetais, tanto físicas quanto comportamentais, na ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento animal durante a prenhez e imediatamente após o nascimento.

A utilização de um protocolo experimental contendo índices relacionados à reprodução e desenvolvimento fetal pode identificar possíveis efeitos em decorrência da exposição dessas substâncias. Tal conhecimento poderá levar a melhores escolhas na prevenção do risco à saúde humana devido ao uso de xenobióticos (Nurminen, 1995; Nelson, 1991).

O protocolo utilizado no presente trabalho foi previamente utilizado de forma similar com outros pesticidas como os inseticidas aldrin e metamidofós e os fungicidas mancozeb e clorotalonil (Castro et al., 1992; Castro et al., 1999; Castro et al., 2000a; Castro et al., 2000b). Ele foi capaz de detectar, nos casos estudados, alterações sutis no desenvolvimento físico e/ou motor dos filhotes expostos durante a prenhez e/ou lactação.

Efeito do paclobutrazol na reprodução e no desenvolvimento perinatal

Foram estudados os possíveis efeitos do paclobutrazol (Cultar®) na reprodução e no desenvolvimento animal, em ratos jovens, expostos perinatalmente por meio da avaliação de alguns parâmetros físicos e comportamentais, para o estabelecimento de indicadores desta exposição. Os indicadores usados inicialmente foram porcentagem de fertilidade, presença de abortamentos e número de natimortos. Estes foram complementados com outros parâmetros como o desenvolvimento físico e neurológico dos reflexos dos filhotes. Para este estudo foram utilizadas ratas Wistar, mantidas em condições padronizadas de luz, umidade e temperatura, no biotério da Embrapa Meio Ambiente, sendo as matrizes fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas. O paclobutrazol foi dissolvido em solução de NaCl 0,9% para que a dose fosse de 1mg kg^{-1} , administrada por via oral. A solução controle foi constituída de NaCl 0,9%.

As fêmeas foram divididas em grupos e expostas durante o período de organogênese (7º, 11º e 15º dias de prenhez) ao paclobutrazol, perfazendo dois grupos experimentais e seus respectivos controles. Após a exposição ao composto em estudo, um primeiro grupo experimental e seu respectivo controle foram submetidos a cesárea

e os filhotes no 16º dia de prenhez foram avaliados quanto ao número de corpos lúteos, número de implantações, peso do útero e ovários, peso fetal e placentário.

As fêmeas do outro grupo experimental foram pesadas nos 1º, 3º, 6º, 8º, 11º, 15º, 18º, 21º dias de prenhez. Seus filhotes foram avaliados quanto ao desenvolvimento físico e neurocomportamental.

A observação das mães tratadas levou à constatação de que não houve toxicidade materna, pois as fêmeas apresentaram um bom estado geral, com pelagem homogênea, boa elasticidade cutânea, ganho de peso corporal normal e comportamento de auto-limpeza. O produto não causou alterações no peso das mães ou dos filhotes, porém a viabilidade ao desmame mostrou-se diminuída, em respectivamente 82,65% e 95,55% para os animais dos grupos experimental e controle (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Avaliação da taxa de viabilidade ao nascimento e ao desmame em ratas expostas oralmente ao paclobutrazol durante o 7º, 11º e 15º dias de prenhez. Dados apresentados em porcentagem, $p < 0,05$.

Parâmetros (%)	Grupos	
	Controle	Paclobutrazol
Fertilidade	100,0 (7/7)	100,0 (10/10)
Viabilidade dos filhotes ao nascimento	100,0 (45/45)	100,0 (98/98)
Viabilidade ao desmame	95,55 (43/45)	82,65 (81/98)

Tabela 2. Peso corporal médio (g) das mães e de seus filhotes expostas oralmente ao paclobutrazol durante o período de organogênese, nos 7º, 11º e 15º dias de prenhez.

Dias / Grupos	Controle	Paclobutrazol
Fêmeas 1	232,71 ± 21,00	253,00 ± 32,80
Fêmeas 7	250,43 ± 20,76	270,30 ± 26,44
Fêmeas 14	267,43 ± 22,42	284,80 ± 32,20
Fêmeas 21	266,00 ± 20,36	283,30 ± 33,70
Filhotes 1	5,98 ± 1,16	5,53 ± 1,09
Filhotes 7	12,60 ± 1,84	11,66 ± 1,25
Filhotes 14	24,01 ± 4,34	20,53 ± 2,23
Filhotes 21	37,18 ± 8,93	36,52 ± 5,07

Quadro 7.1

Exposição de fêmeas durante a prenhez: para o acasalamento, cada macho foi colocado em gaiolas contendo duas fêmeas. Essas fêmeas foram previamente examinadas e selecionadas para que estivessem nas fases de proestro/estro e com ciclo estral regular, verificados por meio de lavado vaginal, sendo então separadas para o acasalamento. No 15º dia de prenhez as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais. A presença de espermatozóides no lavado vaginal das ratas foi considerada como indicativa do 1º dia de prenhez.

Grupos de animais testados:

1. Controle (C): animais que receberam apenas o veículo (solução fisiológica) e tiveram seus filhotes observados quanto ao seu desenvolvimento físico e neurocomportamental;
2. Controle 1 (C 1): animais que receberam apenas o veículo (solução fisiológica), e foram sacrificados no 16º dia de prenhez para avaliação de efeitos embriofetotóxicos;
3. Controle 2 (C 2): animais que receberam apenas o veículo (solução fisiológica), e foram sacrificados no 20º dia de prenhez para avaliação de efeitos embriofetotóxicos;
4. Cultar (CUL): animais que receberam 1,0mg kg⁻¹ de peso corporal de paclotrazol e tiveram seus filhotes observados quanto ao seu desenvolvimento físico e neurocomportamental;
5. Cultar (CUL 1): animais que receberam 1,0mg kg⁻¹ de peso corporal de paclotrazol e foram sacrificados no 16º dia de prenhez para avaliação de efeitos embriofetotóxicos;
6. Cultar (CUL 2): animais que receberam 1,0mg kg⁻¹ de peso corporal de paclotrazol e foram sacrificados no 20º dia de prenhez para avaliação de efeitos embriofetotóxicos.

Escores observados quanto a natação:

0 = Nariz abaixo da superfície

1 = Nariz na superfície

2 = Nariz e topo da cabeça na superfície e orelhas abaixo

3 = Idem 2, mas ouvido na superfície

4 = Idem 3, mas água abaixo da orelha

Além desses parâmetros foram observados outros, físicos e neurocomportamentais, no desenvolvimento de filhotes de fêmeas tratadas. Na Tabela 3 pode-se ver os resultados obtidos quando da observação dos parâmetros do desenvolvimento físico dos filhotes: descolamento de orelha, aparecimento de penugem, erupção do dente incisivo, aparecimento de pêlo, abertura de ouvido, abertura de olho e descida dos testículos, sendo que para estes parâmetros foram observados todos os filhotes dos dois grupos. Foram ainda verificados os reflexos de endireitamento, de sobressalto e de agarrar, bem como a resposta de subir. Em relação aos parâmetros observados, só foram constatadas alterações quanto ao reflexo de sobressalto.

Já em relação a atividade motora dos filhotes testados em um aparelho de campo aberto não foram observadas alterações entre os filhotes expostos ao paclobutrazol e os do grupo controle. O teste mostra o comportamento de locomoção (Lo), levantar e tempo de parado (Pa), onde foram testados 10 filhotes (1 por ninhada) no grupo de mães tratadas com paclobutrazol e 7 filhotes (1 por ninhada) no grupo de mães controle, durante a organogênese, nos dias 7°, 11° e 15° dias de prenhez (Tabela 4). Foi observada alteração no comportamento de levantar. Apesar de observada a alteração neste comportamento, os desvios-padrões observados no teste como um todo, foram bastante elevados. Este fato sugere que a metodologia empregada para a avaliação da atividade geral dos animais talvez não seja a mais sensível como bioindicadora da exposição ao produto.

Tabela 3. Avaliação dos parâmetros físicos de filhotes de fêmeas tratadas com $1,0\text{mg kg}^{-1}$ de paclobutrazol, oralmente, durante o período de organogênese, no 7º, 11º e 15º dias de prenhez. São apresentados os dias de vida (média e desvio-padrão) no qual ocorreu a manifestação do parâmetro do desenvolvimento nos filhotes, a $p < 0,05$.

Parâmetro / Grupo	Dias de vida para manifestação do parâmetro	
Descolamento de orelha		
Controle	2,71	0,48
Paclobutrazol	3,10	0,73
Aparecimento de pêlo		
Controle	5,40	0,37
Paclobutrazol	5,14	0,51
Erupção do dente incisivo		
Controle	4,57	0,78
Paclobutrazol	4,90	0,73
Abertura de ouvido		
Controle	11,57	0,97
Paclobutrazol	11,90	1,19
Abertura de olho		
Controle	14,00	0,57
Paclobutrazol	14,80	1,68
Descida dos testículos		
Controle	23,14	1,95
Paclobutrazol	23,70	1,70
Reflexo de endireitamento		
Controle	2,95	0,97
Paclobutrazol	2,90	0,96
Reflexo de agarrar		
Controle	3,61	0,74
Paclobutrazol	3,60	0,72
Resposta de subir		
Controle	7,47	1,83
Paclobutrazol	7,83	1,53
Reflexo de sobressalto		
Controle	13,23	0,94
Paclobutrazol	13,20	1,66

Tabela 4. Atividade geral de filhotes de ratas expostos oralmente ao paclobutrazol, durante o período de organogênese, no 7º, 11º e 15º dias de prenhez. São apresentadas as médias e respectivos desvios-padrões de cada parâmetro observado por seis minutos (LO = locomoção; LE = levantar; PA = parado), a $p < 0,05$.

Parâmetro / dia de vida do teste	Grupos	
	Controle	Paclobutrazol
LO 21	7,57 ± 4,88	22,65 ± 16,11
LO 30	26,43 ± 10,89	24,00 ± 17,65
LO 60	16,14 ± 13,55	17,25 ± 12,76
LE 21	7,07 ± 3,81	12,65 ± 5,72 a
LE 30	12,21 ± 5,13	14,90 ± 11,07 a
LE 60	5,14 ± 4,59	5,80 ± 3,30 a
PA 21	4,07 ± 9,27	3,90 ± 6,77
PA 30	10,36 ± 21,52	18,25 ± 29,12
PA 60	17,50 ± 22,93	17,75 ± 38,34

Em outro teste para avaliar o desenvolvimento neuromotor dos filhotes de ratas expostos ao tratamento e seus respectivos controles, foi observado o comportamento de nadar de acordo com uma escala de escores. Também não foram observadas alterações significativas entre os animais dos grupos experimental e controle (Tabela 5).

Tabela 5. Comportamento de nadar de filhotes, cujas mães foram tratadas oralmente com 1,0mg kg⁻¹ de paclobutrazol durante o período de organogênese, no 7º, 11º e 15º dias de prenhez. São apresentadas as medianas dos escores observados.

Dias/vida	Grupos	
	Cultar (n = 10)	Controle (n = 7)
7º	0	1
14º	2	2
21º	4	4

n = número de animais

Após a exposição ao regulador de crescimento vegetal em estudo, outras ratas prenhes foram submetidas a cesárea no 16° e 20° dia de prenhez. Estas fêmeas tiveram calculados o peso de seu útero, dos filhotes nele contidos, da placenta e dos ovários. Para tanto, foram utilizadas 10 ratas em cada grupo e os dados obtidos foram avaliados utilizando as médias e seus desvios padrões (Tabela 6).

Tabela 6. Peso médio (g) (média e desvio-padrão) do útero, filhotes, placenta e ovário de fêmeas tratadas oralmente com 1,0mg kg⁻¹ de paclobutrazol, durante o período de organogênese, no 7°, 11° e 15° dias de prenhez e sacrificadas no 16° e 20° dias de prenhez. Foram utilizadas 10 fêmeas em cada grupo.

Peso (g) / Dias de prenhez	Grupos			
	Cultar (n=20)		Controle (n=20)	
	16°	20°	16°	20°
Útero	10,41 ± 5,67	32,10 ± 11,96	12,56 ± 3,31	33,56 ± 5,63
Filhote	0,31 ± 0,15	2,20 ± 0,28	0,24 ± 0,07	2,04 ± 0,18
Placenta	0,24 ± 0,10	0,54 ± 0,10	0,20 ± 0,02	0,46 ± 0,05
Ovário	0,16 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,21 ± 0,06

Os dados de literatura a respeito do paclobutrazol em relação ao tema aqui abordado são geralmente escassos. De forma geral, conclui-se que o paclobutrazol demonstrou certa toxicidade perinatal em filhotes de ratos na dose testada, demonstrada pela diminuição da sobrevivência ao desmame e por afetar alguns dos indicadores testados relativo ao desenvolvimento neuromotor desses animais.

Esses resultados estão na mesma direção daqueles obtidos por Vergieva (1998), que testou a exposição a 50 ou 200mg kg⁻¹ de paclobutrazol entre os dias 6 a 15 da prenhez e a 200 ou 500mg kg⁻¹ nos dias 7, 9, 11 ou 13 da prenhez em ratas Wistar. Foram observados algumas mal-formações fetais em decorrência da exposição única, principalmente na maior dose (500mg kg⁻¹). Já a exposição durante os dias 6 a 15 da prenhez provocou diminuição do ganho de peso materno com ambas as doses usadas, além de apresentar uma tendência ao aumento de mal formações na maior dose (500mg kg⁻¹), não sendo observadas porém quaisquer alterações na dose de 50mg kg⁻¹.

Referências Bibliográficas

CASTRO, V.; BERNARDI, M.; PALERM-NETO, J. Evaluation of prenatal aldrin intoxication in rats. *Archives of Toxicology*, v. 66, p. 149-152, 1992.

CASTRO, V.; TAMBASCO, A; PARAÍBA, L.; TAMBASCO, D. Cytogenetic and teratological effects of mancozeb pre natal exposure on rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 42, n. 2, p. 127–134, 1999.

CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. *Toxicology Letters*, v. 118, n. 1-2, p. 93–102, 2000a.

CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Biological monitoring of embryo-fetal exposure to methamidophos or chlorothalonil on rat development. *Veterinary and Human Toxicology*, v. 42, n. 6, p. 361-365, 2000b.

NELSON, B. Evidence for behavioral teratogenicity in humans. *Journal of Applied Toxicology*, v. 11, p. 33-37, 1991.

NURMINEN, T. Maternal pesticide exposure and pregnancy outcome. *Journal of Occupational Medicine*, v. 37, p. 935-940, 1995.

VERGIEVA, T. Single day treatment - a feasible tool in revealing not dependent on maternal toxicity teratogenic potential. *Advanced Experimental Medical Biology*, v. 444, p. 191-199, 1998.

8

Toxicidade do Paclobutrazol em Ambiente Aquático

Claudio Martin Jonsson

Vera Lúcia Ferracini

Lourival Costa Paraiba

Os organismos têm principalmente três vias de exposição aos xenobióticos no ambiente: a) por meio da ingestão de alimento ou água; b) respiração; c) contato externo com a pele ou o exoesqueleto.

A molécula química que passar pelas várias barreiras do organismo pode ser metabolizada pelos tecidos ou ser armazenada. Se a velocidade de excreção do xenobiótico for baixa ou se a molécula química não for metabolizada, haverá acúmulo dela no organismo, podendo chegar a um nível de equilíbrio dependendo da concentração externa à qual o organismo está exposto.

A preocupação com a bioacumulação de um xenobiótico teve início na década de 1960, devido a incidentes com a toxicidade a resíduos de mercúrio metílico em mariscos e falha na reprodução de aves, devido a resíduos de pesticidas clorados em espécies aquáticas. Na década de 1980, houve expansão do estudo de acumulação com o desenvolvimento de modelos de predição, incluindo a bioacumulação em sedimentos, biomagnificação na cadeia alimentar e carcinogênese em espécies nativas (Barron, 1995).

Por exemplo, o paclobutrazol, um regulador de crescimento vegetal com propriedades fungicidas, pode ser facilmente absorvido pelos organismos, pois possui baixa solubilidade em água e alta afinidade por gorduras. Quando esta absorção excede a velocidade de

eliminação, ocorre seu acúmulo, isto é a bioconcentração do composto (Spacie & Hamelink, 1985). Este fenômeno é de grande importância, tanto na manifestação dos efeitos subletais de xenobióticos em organismos não-alvo, quanto na prevenção de contaminação de fontes protéicas de consumo humano (Kanazawa, 1981).

Avaliação da toxicidade aguda e crônica do paclobutrazol em invertebrados aquáticos

Para avaliar a toxicidade aguda e crônica (Quadro 8.1 e 8.2) do regulador de crescimento foram utilizadas culturas do invertebrado aquático *Daphnia similis*, mantidas em recipientes de vidro de 500mL, contendo água reconstituída (pH= 7,8; condutividade = 320 μ S/cm; dureza total = 110mg CaCO₃ L⁻¹) e enriquecida com macronutrientes, elementos traços e vitaminas (Elendt & Bias, 1990). Os recipientes foram mantidos em sala climatizada, com temperatura controlada de 20 \pm 2° C e luminosidade de 1000lux. Os organismos foram alimentados três vezes por semana com cultura de microalga clorofícea *Selenastrum capricornutum*.

Quadro 8.1

Toxicidade aguda: o teste agudo consistiu na exposição de grupos de 10 organismos jovens (idade inferior a 24 horas) a seis concentrações (270, 350, 450, 590, 770 e 1000mg L⁻¹) de Cultar . Os controles foram preparados pela adição de água reconstituída. A imobilização dos organismos-teste foi registrada após 48 horas. A concentração efetiva média CE₅₀-48h, e seu correspondente intervalo de confiança a nível de 50%, foi estimada pela análise de probitos utilizando-se o módulo *Proc PROBIT do System SAS^R* (SAS,1989).

Foi observado que comparativamente ao controle, os efeitos agudos letais manifestaram-se mais nitidamente em concentrações superiores a 590mg L⁻¹ de Cultar®, sendo o intervalo de confiança de 567,3 a 718,5mg L⁻¹ para CE₅₀-48h, equivalente a 636,3mg L⁻¹ (159mg L⁻¹ de ingrediente ativo). Nestes valores, o Cultar® pode ser classificado como praticamente atóxico para o organismo-teste. O valor de CE₅₀-48h (concentração efetiva média) estimado no presente trabalho para o Cultar® foi aproximadamente 22 vezes

superior ao relatado para seu ingrediente ativo (98,2% de pureza) em *D. magna* (Liu et al., 1996). Apesar destes autores terem trabalhado com outra espécie do gênero *Daphnia*, os dados sugerem uma diminuição da toxicidade do ingrediente ativo quando formulado. Alguns autores demonstraram diminuição da toxicidade do ingrediente ativo quando ele está presente na forma de suspensão aquosa. Assim por exemplo, a toxicidade da deltametrina para ratos é de alta a moderada quando o composto está em um veículo não aquoso. A sua toxicidade diminuiu aproximadamente de 36 a 160 vezes quando na forma de suspensão aquosa (WHO-Working Group, 1990).

No caso da toxicidade crônica foi observado que, para as concentrações de 6,0; 19,2; 62,2 e 199mg L⁻¹ houve inibição total da reprodução. No entanto, não houve efeito na reprodução quando comparado os tratamentos controle e a menor dose do composto.

Quadro 8.2

Toxicidade crônica: em recipientes de vidro foram preparadas em água reconstituída, seis soluções-teste contendo Cultar® nas seguintes concentrações: 0,56; 1,92; 6,0; 19,2; 62,2 e 199mg L⁻¹, correspondentes respectivamente, a 1/1136 CE₅₀-48h, 1/331 CE₅₀-48h, 1/106 CE₅₀-48h, 1/30 CE₅₀-48h, 1/9 CE₅₀-48h e 1/3 CE₅₀-48h. Os controles continham água de diluição isenta do produto-teste. Em cada recipiente foram colocados 12 neonatos de *D. similis* com idade inferior a 24 horas, os quais foram expostos nas condições de temperatura e luminosidade descritas. O estudo teve duração de 21 dias, sendo que a renovação das soluções-teste e dos controles foi realizada três vezes por semana.

Na Figura 1 são apresentados os dados com a menor dose de exposição com efeito, assim como a dose de exposição sem efeito observado, correspondentes respectivamente às concentrações de 1,92 e 0,56mg L⁻¹.

Os valores de CE₅₀-48h e de menor concentração testada com efeito na reprodução de *D. similis*, corresponderiam a 80 e 0,25 vezes a dose recomendada de Cultar® aplicada em campo, distribuída em lâmina de água de 15cm de profundidade. Pelos resultados obtidos, seria necessária uma coluna de água de aproximadamente 215cm para que os efeitos sobre a taxa de reprodução não se manifestassem.

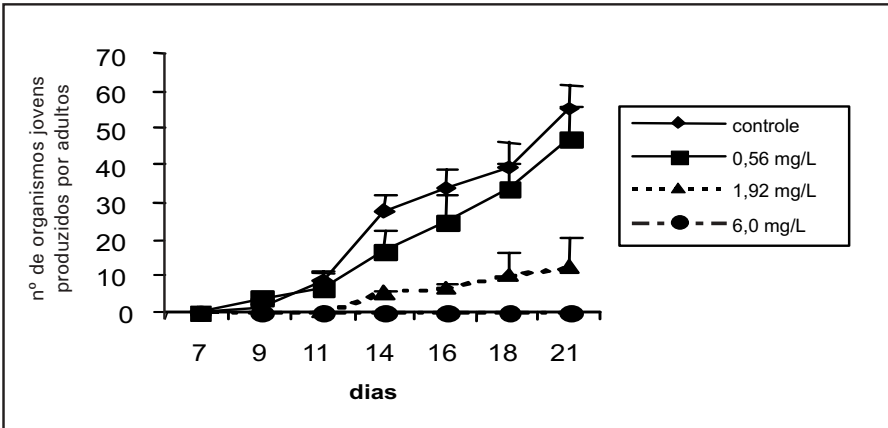


Figura 1. Reprodução de *Daphnia similis* exposta ao Cultar®.

Efeitos do paclobutrazol sobre a atividade de algumas enzimas em peixes

Foi avaliada a atividade de algumas enzimas em uma espécie de peixe autóctone pertencente a família Characidae, para verificar a presença de paclobutrazol em corpos de água bem como a sua bioconcentração (Quadro 8.3). Estas informações são importantes para ampliar o conhecimento sobre a ação de xenobióticos usados no Brasil, sobre organismos não-alvo.

A transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e a lactato desidrogenase (LDH) são enzimas amplamente presentes em todos os organismos. Estas enzimas não somente funcionam como enzimas de ligação entre o metabolismo de proteínas e carboidratos, mas também servem como indicadores de condições fisiológicas ou estruturais alteradas. Estas enzimas desempenham um papel importante em condições de estresse ocasionados por agentes químicos, e têm sido objeto de estudos devido a alteração de sua atividade em organismos aquáticos sob exposição aguda ou crônica a xenobióticos (Rao et al., 1990; Asztalos et al., 1990; Reddy et al., 1995), incluindo compostos com ação fungicida (Rojik et al., 1983, Tiedge et al., 1986).

A enzima glutathione S-transferase (GST) desempenha um papel importante na detoxificação e eliminação de compostos eletrofílicos, incluindo xenobióticos. Sua estimulação envolve reações de conjugação na presença de glutathione. Assim, animais aquáticos que habitam ambientes poluídos podem estar expostos a xenobióticos, os quais sofrem detoxificação mediada pela glutathione na sua forma reduzida, catalisada pela enzima glutathione S-transferase. Esta enzima de biotransformação tem sido estudada em trabalhos de campo no monitoramento de poluentes de origem industrial (Kantoniemi et al., 1996; Fenet et al., 1998) e agrícola (Cho et al., 1999).

Quadro 8.3

Composto-teste: paclobutrazol ((2RS,3RS)-1-(4-chlorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) pentan-3-ol) sob a forma de uma suspensão concentrada (Cultar) contendo 250g L⁻¹ de ingrediente ativo. Soluções com concentrações de 3 e 30mg L⁻¹ de ingrediente-ativo foram preparadas com a mesma água utilizada durante o período de aclimação.

Organismo-teste: peixes “pacú prata” (*Metynnis argenteus*) pesando em média 5g, foram mantidos em água de poço artesiano com as seguintes características: temperatura 26-29°C; pH 7,8; dureza total 36mg L⁻¹ CaCO₃ ; condutividade 190 S cm⁻¹, para aclimação. Após este período (superior a 10 dias) os organismos foram submetidos a um fotoperíodo de 16h luz (500lux)/8h escuro.

Sistema de exposição: as exposições foram realizadas em sistema semi-estático com troca das soluções uma vez por semana. Os controles foram preparados com água isenta do composto-teste. Os peixes foram submetidos às mesmas condições ambientais descritas.

Estudo de alterações bioquímicas: cinco ou seis peixes provenientes de aquários contendo 3 e 30mg L⁻¹ de paclobutrazol foram retirados no 7^o, 14^o e 28^o dia de exposição. Os organismos sacrificados tiveram parte do tecido muscular e fígado separados para análise enzimática.

A atividade da TGO foi determinada por meio da metodologia descrita por Frankel & Reitman (1963). Não foram observadas alterações significativas nesta atividade nos dois tecidos estudados, durante o período total de exposição (28 dias). No entanto, na

maior concentração testada, foi observada mortalidade dos organismos após 7 dias de exposição, o que não permitiu avaliar as alterações bioquímicas para esta concentração. Dados da literatura também demonstraram que, assim como o paclobutrazol, outros compostos com propriedades fungicidas foram incapazes de alterar a TGO em peixes sob condições experimentais. Como exemplo, o fungicida pentaclorofenol, na concentração de 0,1 e 0,2mg L⁻¹, não alterou os níveis séricos de TGO em *Leuciscus idus melanotus* L. após quatro horas, enquanto outros fungicidas fenólicos foram responsáveis pela alteração da enzima (Tiedge et al., 1986).

A atividade de GST determinada de acordo com o método cinético descrito por Habig et al. (1974) apresentou um aumento significativo no caso de fígado exposto à concentração de 30mg L⁻¹ de paclobutrazol, quando comparado ao controle. O mesmo fenômeno ocorreu para a LDH (determinada pelo método descrito por Vassault, 1983), no caso de peixes expostos a 3mg L⁻¹ do regulador de crescimento durante 28 dias, porém o efeito foi menos significativo. O aumento de LDH após o 28º dia de exposição indica que o peixe utilizou de mecanismos anaeróbicos de respiração de modo a suprir a demanda de energia quando a oxidação aeróbica foi comprometida. Apesar deste mecanismo de compensação ocorrer também no tecido muscular, os resultados obtidos não evidenciaram alterações na atividade de LDH neste tecido.

Similarmente aos resultados apresentados, Samuel & Sastry (1989) não observaram efeitos significativos na atividade de LDH em fígado e músculo do peixe *Channa punctatus* exposto a 1mg L⁻¹ (1/10 CL₅₀-96h) do inseticida monocrotofós durante duas semanas de exposição, sendo que o aumento da atividade foi evidenciada aos 30 dias de exposição.

À semelhança do observado para a LDH, a indução de GST foi manifestada no tecido hepático, não se constatando um aumento de sua atividade em tecido muscular. Estes resultados são aceitáveis já que o fígado é o principal órgão de biotransformação de xenobióticos em seres vivos. Otto & Moon (1995) obtiveram

respostas semelhantes após o tratamento de peixes com 3,3',4,4'-tetraclorobifenil, o qual induziu a atividade de GST hepática em aproximadamente duas vezes, não tendo ocorrido este efeito no tecido muscular.

Outros autores também relataram a detoxificação de outros compostos com propriedades fungicidas realizada pela GST. Gallagher & Di Giulio (1992) observaram que a metabolização do clorotalonil de frações do citosol de branquias do peixe *Ictalurus punctatus* foi diminuída na ausência de glutathione reduzida.

Em vista dos resultados obtidos no presente trabalho, a fase II do metabolismo, envolvendo reações de conjugação, deve ser um dos processos na conversão do paclobutrazol em compostos mais facilmente eliminados. Também, as alterações ocorridas na atividade da GST e LDH sugerem que a medida da atividade destas enzimas na espécie testada poderia ser usada como um biomarcador associado à contaminação aquática por paclobutrazol. Porém, haveria algumas limitações quanto a implementação de seu uso. Primeiramente, a atividade de GST aumentou em concentrações relativamente altas do composto na água, as quais seriam atingidas quando fosse ultrapassada em muitas vezes a dose de aplicação agrônômica, o que poderia limitar a aplicabilidade de seu uso em programas de monitoramento ou avaliação de risco. Por outro lado, embora tenha se constatado um aumento significativo da atividade da LDH para a menor concentração testada, esta indução se manifestou somente num período superior a duas semanas de exposição, o que limitaria a obtenção de resultados a curto prazo.

A ausência de alterações na atividade da TGO sugere que a sua medida não seria útil como indicadora da poluição aquática pelo paclobutrazol e que este composto não estaria interferindo numa das importantes fases de transaminação no metabolismo de aminoácidos.

Bioconcentração de paclobutrazol em peixes

Denomina-se fator de bioconcentração (FBC) a relação entre a concentração do composto no tecido do organismo e na água, na situação de equilíbrio, podendo este parâmetro também ser calculado por constantes cinéticas. Para avaliar o FBC do regulador de crescimento paclobutrazol foram analisadas amostras de águas de aquários, bem como tecido muscular de peixes coletados no 7º, 14º, 21º e 28º dias de exposição ao composto orgânico.

A concentração de paclobutrazol determinada em músculo, ao final da exposição, atingiu níveis residuais de 166mg kg^{-1} para a concentração média de $2,7\text{mg L}^{-1}$ determinada na água (FBC = 61). O FBC estimado para o paclobutrazol na situação de equilíbrio foi equivalente a 73. Este valor está muito próximo ao calculado a partir dos resultados de resíduos de paclobutrazol em músculo do peixe *Carassius auratus* relatados por Liu et al. (1996).

Comparando-se o valor de FBC calculado para paclobutrazol com os de outros compostos com propriedades fungicidas, observa-se que ele apresenta semelhante ordem de grandeza para aqueles relatados na literatura. Assim, Tsuda et al. (1992) relataram um FBC equivalente a 25 e 100, respectivamente, para o clorotalonil e captan no peixe *Gnathopogon caerulescens*. O tiabendazol demonstrou ter um FBC equivalente a 23 no tecido muscular de *Lepomis macrochirus* (Van den Heuvel et al., 1997). Os valores de FBC calculados para isoprothiolane, iprobenfós, edifenfós e carbendazim em diversas espécies de peixes foi equivalente a 45 (Tsuda et al., 1997), 26 (Tsuda et al., 1990), 110 (Tsuda et al., 1994) e 27 (WHO Working Group, 1993), respectivamente. Porém, o paclobutrazol apresentou valor de FBC de 2 a 6 vezes menor que o estimado para o benomil em outras espécies de peixes (U.S. National Library of Medicine, 1995; Howard, 1991).

O baixo potencial de acúmulo do paclobutrazol em tecidos, quando comparado a outros fungicidas com valores de FBC muito mais elevados, tal como é o caso do pentaclorofenol (FBC = 1680) (Tachikawa et al., 1991), parece não estar associado aos valores

de coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), visto que são descritos valores deste parâmetro físico-químico equivalentes a 1590 (Worthing & Hance, 1991) e 5,12 (*U.S. National Library of Medicine*, 1995), respectivamente, para o paclobutrazol e para o pentaclorofenol.

De acordo com valor estimado de FBC e com o valor da ingestão diária aceitável (IDA) para o paclobutrazol ($0,1\text{mg kg}^{-1}$ peso corpóreo) (Worthing & Hance, 1991), a concentração máxima permitida do ingrediente-ativo em corpos de água para evitar efeitos adversos quanto ao consumo do peixe, seria equivalente a $0,2\text{mg L}^{-1}$. Este valor foi estimado considerando-se o peso de um indivíduo adulto de 70kg que consumiria diariamente 500g do peixe, sendo que essa concentração na água seria atingida pela aplicação direta da dose máxima recomendada do paclobutrazol ($3,0\text{kg i.a. ha}^{-1}$) sobre uma lâmina de água de 150cm.

Conclui-se assim que a exposição dos organismos-teste ao paclobutrazol, em função do seu baixo fator de bioconcentração no tecido muscular de peixes, possuiria baixo risco para a saúde humana quanto ao consumo de pescado, a não ser em situações extremas de exposição dos organismos aquáticos.

Referências Bibliográficas

ASZTALOS, B.; NEMCSOK, J.; BENEDECZKY, R. G.; SZABO, A.; REFAIE, O. J. The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 19, p. 275-282, 1990.

BARRON, M. G. Bioaccumulation and bioconcentration in aquatic organisms. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JR., G. A.; CAIRNS JR., J. (Ed.). *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton: Lewis Publishers/CRC Press, 1995. p. 652-666.

CHO J. R.; KIM Y. J.; HONG K. J.; YOO J. K.; LEE J. O.; AHN Y. J. Resistance monitoring and enzyme activity in field-collected populations of the spiraea aphid, *Aphis citricola* Van der Goot. *Journal of Asian Pacific Entomology*, v. 2, n. 2, p. 113-119, 1999.

ELENDT, B. P.; BIAS, W. R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. Magna* *Water Research*, Elmsford, v. 24, n. 9, p. 1152-1167, 1990.

FENET, H.; CASELLAS, C.; BONTOUX, J. Laboratory and field caging studies on hepatic enzymatic activities in european eel and rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 40, p. 137-143, 1998.

FRANKEL, S.; REITMAN, S. *Granwhol's clinical laboratory and diagnosis*. v. 1. 6 ed. London: The C.V. Mosby Company, 1963. 222p.

GALLAGHER, E. P.; DI GIULIO, R. T. Glutathione mediated chlorothalonil detoxification in channel catfish gills. *Marine Environmental Research*, v. 34, p. 221-226, 1992.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HOWARD, P. H. Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. v. III: *Pesticides*. Chelsea: Lewis Publishers, 1991.

KANAZAWA, J. Measurement of the bioconcentration factors of pesticides by freshwater fish and their correlation with physicochemical properties or acute toxicities. *Pesticide Science*, v. 12, p. 417-424, 1981.

KANTONIEMI, A.; KIRSI, V.; OIKARI, A. The capacity of liver microsomes to form benzo(a)pyrene-diolepoxide - DNA adducts and induction of cytochrome P450 1A in feral fish exposed to pulp mill effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 35, p. 136-141, 1996.

LIU, Z. T.; KONG, M. Z.; ZHOU, F.; WANG, S. L. Bioconcentration and toxicity effect on lipid content of aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 56, p. 135-142, 1996.

OTTO, D. M. E.; MOON, T. W. 3,3',4',4'-tetrachlorobiphenyl effects on antioxidants enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. *Pharmacology and Toxicology*, v. 77, p. 281-287, 1995.

RAO, R. V. K.; SURENDRANATH, P.; KODAVANTI, P. R. S. Levels of transaminases in tissues of the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) following sublethal kelthane exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 44, p. 114-120, 1990.

REDDY, A. N.; VENUGOPAL, N. B. R. K.; REDDY, S. L. N. Effect of endosulfan 35 EC on some biochemical changes in the tissues and haemolymph of a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*. *Bulletin of Environmental Contamination of Toxicology*, v. 55, p. 116-121, 1995.

ROJIK, I.; NEMSOK, J.; BOROSS, L. Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. *Acta Biologica Hungarica*, v. 34, p. 81-92, 1983.

SAMUEL, M.; SASTRY, K. V. In vivo effect of monocrotophos on the carbohydrate metabolism of the freshwater snake head fish: *channa punctatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 34, p. 1-8, 1989.

SAS Institute Inc. SAS/STAT[®] user's guide, version 6. 4.ed. Cary, NC, 1989. v. 2, p. 1325-1350.

SPACIE, A.; HAMELINK, J. L. Bioaccumulation. In: RAND, G. R.; PETROCELLI, S. R. (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, 1985. p. 495-525.

TACHIKAWA, M.; SAWAMURA, R.; OKADA, S.; HAMADA, A. Differences between freshwater and seawater killifish (*Oryzias latipes*) in the accumulation and elimination of pentachlorophenol. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 21, n. 1, p. 146-151, 1991.

TIEDGE, H.; NAGEL, R.; URICH, K. Effect of substituted phenols on transaminase activity in the fish, *leuciscus idus melanotus* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 36, p. 176-180, 1986.

TSUDA, T.; AOKI, S.; KOJIMA, M.; HARADA, H. Bioconcentration and excretion of diazinon, IBP, malathion and fenitrothion by carp. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 96, n. 1, p. 23-26, 1990.

TSUDA, T.; AOKI, S.; KOJIMA, M.; FUJITA, T. Accumulation and excretion of pesticides used in golf courses by carp (*Cyprinus carpio*) and willow shiner (*Gnathopogon caerulescens*). *Comparative Biochemistry Physiology-C-Comparative Pharmacology and Toxicology*, v. 101, n. 1, p. 63-66, 1992.

TSUDA, T.; AOKI, S.; KOJIMA, M.; FUJOTA, T. Pesticides in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa (III). *Toxicological and Environmental Chemistry*, v. 41, n. 1-2, p. 85-90, 1994.

U.S. National Library of Medicine. Hazardous substances data bank, Bethesda, 1995.

VAN DEN HEUVEL, W. J. A.; WISLOCKI, P. G.; HIRSCH, M. P.; PORTER, N. K.; AMBROSE, R. T.; ROBILLARD, K. A. Bioconcentration and metabolism of thiabendazole [2-(4-thiazolyl)-1H-benzimidazole] in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 3, p. 985-989, 1997.

VASSAULT, A. Lactate dehydrogenase. In: BERGMEYER, H. V. (Ed.). *Methods in enzymatic analysis*. v. III. Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 1983. p. 118-126.

WHO Working-group. Deltamethrin. Environmental Health Criteria, v. 97, 1990. p. 133.

WHO Working-group. Benomyl. Environmental Health Criteria, v. 148, 1993. p. 135.

WORTHING, C. R.; HANCE, R. J. *The pesticide manual*. 9 ed. Surrey: The British Crop Protection Council, 1991. p. 644.



Meio Ambiente

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

