

FITOTOXICIDADE DE MISTURAS DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE HERBICIDAS A BASE DE 2,4-D E GLIFOSATO EM *Allium cepa*

Gabriele Bitencourt Tavares¹, Francisco Almança Trujillo¹, Victor Ventura de Souza², Tatiana da Silva Souza¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Bairro Alto Universitário – 29.500-000 – Alegre/ES, Brasil, gabrielebtavares@gmail.com, francisco454748@gmail.com, tatianas.souza@hotmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais/Departamento de Morfologia, Avenida Antônio Carlos, Bairro Pampulha – 31.270-901 – Belo Horizonte/MG, Brasil, victorventurabh@yahoo.com.br.

Resumo

Os herbicidas 2,4-D e glifosato são os pesticidas mais comercializados no Brasil. A mistura de agrotóxicos é uma prática muito comum entre os produtores agrícolas, sobretudo a associação entre o 2,4-D e o glifosato. Em vista disso, estes pesticidas são comumente encontrados simultaneamente em águas superficiais e/ou potável. O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos fitotóxicos destes herbicidas em *Allium cepa* (cebola). As concentrações testadas foram: 0,4, 4, 40 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D e 0,65, 6,5, 65 e 650 $\mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato e as misturas entre elas; baseadas nos valores máximos permitidos pela legislação brasileira. Os parâmetros avaliados foram o índice de germinação (IG) e o crescimento radicular. Ocorreu uma diminuição do IG a 40 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ do 2,4-D, a 6,5 e 650 $\mu\text{g L}^{-1}$ do glifosato e na mistura com as maiores concentrações dos herbicidas (M-4) em relação ao controle. Todas as concentrações e misturas reduziram o crescimento radicular de *A. cepa*. Estes resultados chamam atenção para o potencial fitotóxico destes herbicidas em organismo não-alvo.

Palavras-chave: Potencial fitotóxico. Agrotóxicos. Crescimento radicular. Índice de germinação.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas – Ecologia.

Introdução

O Brasil é o país líder no consumo de pesticidas do mundo. De acordo com o último Boletim de Comercialização de Agrotóxicos (2022) divulgado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o Brasil consumiu 800.652 toneladas de agrotóxicos, representando um aumento de cerca de 11% em relação ao ano anterior (2021), cujas vendas foram de 720.870 toneladas.

Dentre as formulações de agrotóxicos, os herbicidas são os mais comercializados no Brasil, nos quais os princípios ativos mais vendidos são o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o glifosato. Dados entre 2013 e 2022 mostram que as vendas de glifosato e 2,4-D aumentaram aproximadamente 24% na última década. Apenas em 2022 foram comercializadas 266.088 toneladas de glifosato e 65.356 toneladas de 2,4-D, representando 45.94% do total de agrotóxicos comercializados no país (IBAMA, 2022).

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina], pertencente ao grupo químico das glicinas, é um herbicida sistêmico, não seletivo e pós-emergente, amplamente utilizado no controle de ervas daninhas nos cultivos de soja, milho e algodão (Marchi et al., 2008; Anvisa, 2019). O surgimento de plantas daninhas resistentes ao glifosato tem levado à adoção de estratégias que combinam o uso de glifosato com outros herbicidas (Metzler et al., 2011), como o 2,4-D (Takano et al., 2013). O 2,4-D, pertencente ao grupo químico dos ácidos ariloxialcanoicos, é um herbicida sistêmico, seletivo e de pós-emergência, amplamente utilizado no controle de plantas daninhas nos cultivos de soja e trigo (Marchi et al., 2008;

Anvisa, 2019). Uma das consequências diretas dessa ação é a presença simultânea desses agrotóxicos no meio ambiente.

Tanto o glifosato quanto o 2,4-D são altamente solúveis em água. No Brasil, o monitoramento da qualidade de água é regulamentado pela Resolução n. 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). O Ministério da Saúde (MS) por meio da Portaria de Consolidação n. 5 de 2017 regulamenta os níveis de pesticidas permitidos na água para consumo humano. A Tabela 1 contém os valores máximos permitidos de 2,4-D e glifosato na água.

Tabela 1 - Valores máximos permitidos de glifosato e 2,4-D na água em $\mu\text{g L}^{-1}$

Ingrediente ativo	Resolução n. 357/2005 (CONAMA)			Portaria de Consolidação n. 5/2017 (MS)
	Classe I	Classe II	Classe III	Água potável
2,4-D	4	4	30	30
Glifosato	65	65	280	500

De acordo com dados publicados pelo Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Sisagua), em 2018, aproximadamente 40% dos municípios brasileiros detectaram algum tipo de agrotóxico presente em água de torneira, nos quais 60% dos municípios detectaram um “coquetel” com 27 agrotóxicos, dentre eles o 2,4-D e o glifosato. Dentre os 27 agrotóxicos encontrados em águas brasileiras, 21 são proibidos na União Europeia devido aos riscos que oferecem ao meio ambiente e à saúde (Brasil, 2018; Aranha et al., 2019).

Neste cenário, os bioensaios com vegetais superiores são eficientes para a avaliação ecotoxicológica de contaminantes ambientais (Aragão et al., 2019; Fioresi et al., 2020; Miranda et al., 2023). Dentre eles, o bioensaio com *Allium cepa* (cebola) é amplamente utilizado devido a sua alta sensibilidade (Fiskesjö, 1985; Leme e Marin-Morales, 2009), que permite a avaliação de parâmetros tóxicos, citotóxicos e genotóxicos por meio de análises macro e microscópicas. Dentre as análises macroscópicas, o ensaio de fitotoxicidade tem sido amplamente utilizado como uma técnica rápida para indicar o efeito tóxico de contaminantes ambientais no crescimento das plantas (Palmieri et al., 2014; Fatma et al., 2018; Miranda et al., 2023). Neste teste são analisados o índice de germinação e o crescimento radicular que são baseados na quantificação de sementes germinadas e na medição do crescimento radicular após a exposição a contaminantes (HAQ et al., 2016).

A vista disso, este estudo teve como objetivo verificar o potencial fitotóxico dos herbicidas 2,4-D e glifosato, isolados e combinados, em organismo não-alvo (*A. cepa*) em concentrações baseadas nos valores máximos permitidos pela legislação brasileira.

Metodologia

O ensaio de fitotoxicidade foi realizado de acordo com a *US Protection Environmental Agency* (USEPA, 1996). Para a análise, 13 sementes de *A. cepa* foram distribuídas em placas de Petri (3 placas/tratamento) forradas com papel filtro umedecido com as concentrações testadas e as misturas, que foram preparadas combinando-se as menores, intermediárias e maiores concentrações dos herbicidas, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações testadas dos herbicidas 2,4-D e glifosato e suas misturas expressas em $\mu\text{g L}^{-1}$

2,4-D	Glifosato	Mistura
0.4	0.65	0.4 + 0.65 (M-1)
4	6.5	4 + 6.5 (M-2)
40	65	40 + 65 (M-3)
400	650	400 + 650 (M-4)

Fonte: Autores (2024).

As sementes permaneceram em contato com os tratamentos até que 65% das sementes (8 sementes) do controle germinassem e suas raízes atingissem 20 mm de comprimento.

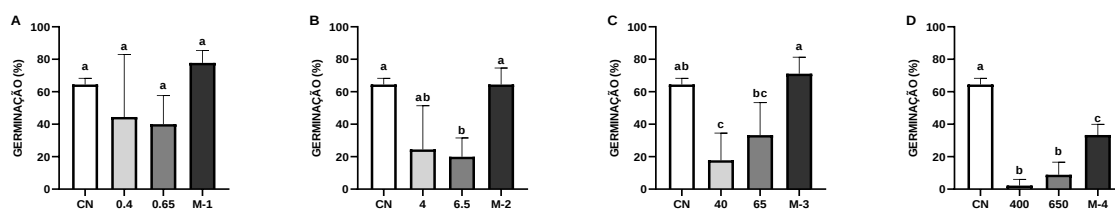
O índice de germinação foi calculado pela fórmula: $IG = (N/A) \times 100$, onde *N* é o número total de sementes germinadas e *A* é o número total de sementes submetidas a germinação. O comprimento final das raízes foi medido com o auxílio de um paquímetro digital.

O software utilizado para a análise estatística foi o *GraphPad Prism* versão 8.0.1. A normalidade dos dados coletados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias mediante o teste de Barlett. Como os dados apresentaram distribuição normal e homogeneidade nas variâncias, as comparações entre os grupos foram feitas por meio de ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados

Os resultados obtidos para o índice de germinação (IG) são mostrados na Figura 1. O índice de germinação mensura a proporção de sementes germinadas em relação ao total de sementes submetidas a germinação. Quando comparado ao controle negativo, o IG diminuiu a 40 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ do 2,4-D (Figura 1C e Figura 1D) e a 6.5 e 650 $\mu\text{g L}^{-1}$ do glifosato (Figura 1B e Figura 1D). Apenas a mistura com as maiores concentrações dos herbicidas (M-4) diferiu do controle causando a diminuição do IG (Figura 1D). Por outro lado, quando comparados entre si, M-2 diferiu do glifosato a 6.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, aumentando o IG (Figura 1B). Em M-3 e M-4, ambas concentrações individuais de 2,4-D e glifosato diferiram das misturas, aumentando o IG (Figura 1C e Figura 1D).

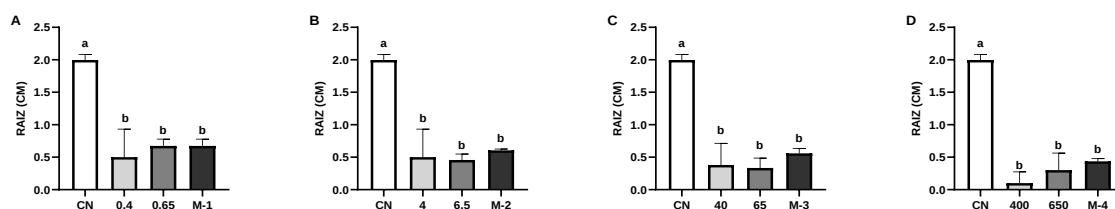
Figura 1 – Média do índice de germinação das sementes. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.



Fonte: Autores (2024).

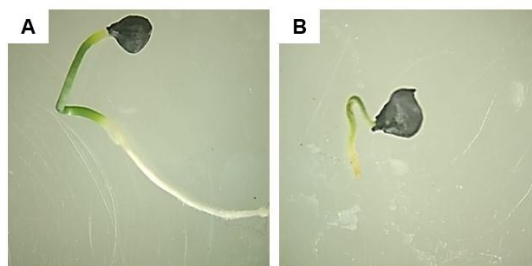
Os resultados obtidos para o crescimento radicular são mostrados nas Figuras 2-3. Todas as concentrações testadas e as misturas diminuíram o crescimento radicular de *A. cepa* em relação ao controle. O efeito das concentrações isoladas e das misturas foi equivalente quando comparadas entre si.

Figura 2 – Média do crescimento radicular das sementes. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.



Fonte: Autores (2024).

Figura 3 – Raízes de *A. cepa*. A) Crescimento radicular normal. B) Crescimento radicular reduzido. Imagem obtida em estereomicroscópio (Leica)



Fonte: Autores (2024).

Discussão

Com o crescimento da agroindústria e da população, as águas superficiais, como rios e lagos, são frequentemente contaminadas por atividades agrícolas (Düsmen et al., 2013). Os ecossistemas aquáticos são extremamente sensíveis à presença de contaminantes (Souza et al., 2020; Brovini et al., 2021; Lima et al., 2023). A ecotoxicologia, por sua vez, busca entender os efeitos tóxicos de substâncias químicas sobre os componentes de um ecossistema de maneira integrada (Relya, 2006). Deste modo, a investigação da toxicidade ambiental envolve uma variedade de métodos que permitem avaliar os efeitos de substâncias tóxicas em organismos vivos.

Dentre os métodos, o ensaio de fitotoxicidade é amplamente utilizado para avaliar o índice de germinação e o crescimento das raízes após exposição a contaminantes ambientais (Parveen et al., 2024). A fitotoxicidade refere-se ao efeito tóxico que substâncias químicas podem exercer sobre as plantas, afetando seu crescimento e desenvolvimento (Magdaleno et al., 2015). Esse efeito tóxico pode resultar em várias alterações fisiológicas nas plantas.

A inibição da germinação é um indicativo de toxicidade aguda, ou seja, que pode levar à morte do embrião. É provável que os herbicidas testados tenham afetado a divisão mitótica das sementes, resultando em uma redução na germinação e no crescimento radicular. De acordo com Harashima e Schnittger (2010), um fator que influencia o crescimento das plantas é a divisão celular no tecido meristemático, que, em conjunto com o alongamento celular, promove o desenvolvimento do tecido. A diminuição de células em divisão causa a redução do crescimento das raízes. Além disso, danos celulares, como o rompimento de membranas e degradação do DNA pode resultar na morte do embrião.

Num estudo prévio, testando as mesmas concentrações, observamos uma diminuição da proporção de células em divisão na maior concentração de 2,4-D ($400 \mu\text{g L}^{-1}$) (Souza et al., 2024). Esse resultado pode ser relacionado com a redução do crescimento radicular a $400 \mu\text{g L}^{-1}$ do 2,4-D observada no nosso estudo. Ademais, Souza et al. (2024) verificaram danos genotóxicos (danos ao DNA) a 6.5, 65 e $650 \mu\text{g L}^{-1}$ do glifosato e a 0.4, 4 e $40 \mu\text{g L}^{-1}$ do 2,4-D. $400 \mu\text{g L}^{-1}$ falhou em induzir alterações cromossômicas. Esse baixo índice de danos pode ser explicado pela ação mitodepressiva dessa concentração. Considerando os dados referente as misturas 2,4-D + glifosato, as misturas (0.4 + 0.65), (4 + 6.5) e (40 e 65) induziram danos genotóxicos.

Em um outro estudo sobre a ação citogenotóxica destes herbicidas combinados, Finkler et al. (2022) verificaram a redução do índice mitótico e o aumento de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas às misturas com concentrações baseadas nas médias aplicadas no campo e nas doses de referência aguda (DRfA), sendo 1.56 e 11.66 mg mL^{-1} para o glifosato e 0.28 e 1.75 mg mL^{-1} para o 2,4-D.

Em síntese, a inibição da germinação e a redução do crescimento radicular podem ser causadas por alterações no ciclo celular, em decorrência da interação direta das células meristemáticas da raiz de *A. cepa* com a combinação dos herbicidas testados.

Conclusão

Conclui-se que todas as concentrações testadas dos herbicidas 2,4-D, glifosato e misturas causaram algum efeito fitotóxico sobre as raízes de *A. cepa*. Os dados apresentados indicam que a inibição da germinação revela toxicidade aguda, enquanto a redução do crescimento radicular pode estar relacionada à atividade citotóxica e genotóxica dos herbicidas, já que o crescimento da raiz depende da atividade de divisão mitótica.

Referências

- ARAGÃO, Francielen Barroso et al. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 65, n. 2, p. 435–443-435–443, 2017.
- ARANHA, A. et al. “Coquetel” com 27 agrotóxicos foi achado na água de 1 em cada 4 municípios. 2019. Disponível em: <https://apublica.org/2019/04/coquetel-com-27-agrotoxicos-foi-achado-na-agua-de-1-em-cada-4-municipios-consulte-o-seu/>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 58-63, 18 mar. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017**. Consolida as normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 360, 03 out. 2017.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. (2022). Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins do Ministério do Meio Ambiente. Brasília, DF, 2022.
- BROVINI, Emília Marques et al. Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 771, p. 144754, 2021.
- DÜSMAN, Elisângela et al. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 1793-1800, 2014.
- FATMA, Firdos et al. Phytotoxicity of pesticides mancozeb and chlorpyrifos: correlation with the antioxidative defence system in *Allium cepa*. **Physiology and molecular biology of plants**, v. 24, p. 115-123, 2018.
- FINKLER, Mariana et al. Cytotoxic and genotoxic effects induced by associated commercial glyphosate and 2, 4-D formulations using the *Allium cepa* bioassay. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 57, n. 2, p. 133-141, 2022.
- FIORESI, Vinícius Sartori et al. Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 28066-28076, 2020.
- FISKESJÖ, Geirid. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.
- HARASHIMA, Hirofumi; SCHNITTGER, Arp. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 1, p. 66-74, 2010.
- HAQ, Izharul et al. Evaluation of the phytotoxic and genotoxic potential of pulp and paper mill effluent using *Vigna radiata* and *Allium cepa*. **Advances in Biology**, v. 2016, 2016.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LIMA, Igor et al. Glyphosate pollution of surface runoff, stream water, and drinking water resources in Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 10, p. 27030-27040, 2023.

MAGDALENO, Anahí. et al. Phytotoxicity and genotoxicity assessment of imazethapyr herbicide using a battery of bioassays. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 19194-19202, 2015.

MARCHI, Giuliano; MARCHI, Edilene Carvalho Santos; GUIMARÃES, Tadeu Graciolli. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. 2008.

METZLER, M. J. et al. Control de *Conyza* spp.(rama negra) en barbecho de soja con glifosato en mezcla con herbicidas residuales y de contacto. In: **Acta del Quinto Congreso de la Soja del Mercosur. Primer Foro de la Soja Asia-Mercosur**. 2011. p. 138-140.

MIRANDA, Luanna Alves. et al. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of pesticide mixtures: analysis of the effects of environmentally relevant concentrations on the aquatic environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 52, p. 112117-112131, 2023.

PALMIERI, Marcel José et al. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 763, p. 30-35, 2014.

PARVEEN, Naseeba et al. Phytotoxicity of trihalomethanes and trichloroacetic acid on *Vigna radiata* and *Allium cepa* plant models. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 4, p. 5100-5115, 2024.

RELYEA, Rick; HOVERMAN, Jason. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. **Ecology Letters**, v. 9, n. 10, p. 1157-1171, 2006.

Sisagua: Detecção e concentração de agrotóxicos de 2014 a 2017 de acordo com dados de controle do Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA). **Ministério da Saúde**, 2018. Disponível em:

DE SOUZA, Renata Mariane et al. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 135, p. 22-37, 2020.

SOUZA, Tatiana da Silva; TAVARES, Gabriele Bitencourt; SOUZA, Victor Ventura. Cytogenotoxicity of 2, 4-D and Glyphosate Herbicides: Effects of Isolated and Combined Environmental Concentrations on Onion Root Tips (*Allium Cepa*). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 235, n. 8, p. 523, 2024.

TAKANO, J.R. et al. Effect of 2.4-D addition to glyphosate for difficult control weeds species. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, p. 1-13, 2013.

Agradecimentos

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Espírito Santo (PIBIC/UFES) pela bolsa concedida e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).