

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CERA EPICUTICULAR DE BIÓTIPOS DE AZEVÉM.
Amanda Azarias Guimarães¹; Samuel José Sant'Anna²; Evander Alves Ferreira¹;
Leandro Vargas; Antonio Alberto da Silva¹; Rafael Gomes Viana¹; Germani
Concenço¹; Ignacio Aspiazu¹; Leandro Galon¹. ¹UFV-DFT, Campus Universitário,
36570-000, Viçosa, MG. ²Estudante de Agronomia-UFV; ³EMBRAPA TRIGO - Passo
Fundo-RS.

RESUMO - Objetivou-se com este trabalho determinar a composição química da cera epicuticular dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistente e sensível ao glyphosate, buscando relações entre suas características e a resistência dos biótipos ao produto. A cera epicuticular foi extraída e quantificada, e os seus constituintes, analisados por cromatografia em fase gasosa, acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM). Para determinação da composição química, amostras de lâmina foliar foram retiradas 30 dias após a emergência das plantas, coletando-se a primeira folha com lígula totalmente visível. A quantidade de cera epicuticular extraída foi maior nas folhas do biótipo de azevém suscetível, todavia sem diferir estatisticamente do biótipo resistente. São os álcoois os compostos mais abundantes observados na cera epicuticular dos biótipos, representados por apenas um composto, o hexacosa-1-ol (46,80% no biótipo resistente e 52,20% no suscetível). Os hidrocarbonetos foram encontrados em maior proporção no biótipo resistente, chegando a 27,69% no resistente e 24,97% no suscetível. Os hidrocarbonetos (compostos pouco polares) presentes na cera epicuticular podem conferir maior dificuldade de absorção do glyphosate (herbicida polar). Ao se comparar a polaridade da cera epicuticular dos biótipos de azevém, constatou-se que tanto no biótipo resistente quanto no suscetível a cera epicuticular apresentou mais de 50% de componentes polares (álcoois e aldeídos) em sua constituição, sendo esse valor igual a 69,80% no biótipo resistente e 64,94% no biótipo suscetível. Por meio dessa caracterização apresentada, pode-se afirmar que existem pequenas diferenças na cera epicuticular dos biótipos de azevém resistente e suscetível ao glyphosate; o biótipo resistente apresentou grau de polaridade pouco superior ao do biótipo suscetível, porém essa diferença não pode ser considerada marcante a ponto de determinar maior ou menor tolerância de um biótipo ou outro ao herbicida glyphosate.

Palavras-chave: glyphosate, resistência, cromatografia, *Lolium multiflorum*.

CHEMICAL COMPOSITION OF EPICUTICULAR WAX OF ITALIAN RYEGRASS BIOTYPES

ABSTRACT - The objective of this work was to determine the chemical composition of epicuticular wax of resistant and susceptible to the glyphosate italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotypes, looking for relationships between their characteristics and the biotypes resistance to the product. The epicuticular wax was extracted and quantified, and its constituents, analyzed by gas chromatography, coupled to mass spectrometer. For the

determination of the chemical composition, leaf blade samples were obtained 30 days after plants emergency, being collected the first leaf with totally visible ligule. The amount of epicuticular wax extracted was larger in the susceptible italian ryegrass biotype leaves, though without statistically differing from the resistant biotype. Alcohols are the most abundant compounds observed in the epicuticular wax of the biotypes, represented by only one compound, the hexacosan-1-ol (46,80% in the resistant biotype and 52,20% in the susceptible). Hydrocarbons were found in larger proportion in the resistant biotype, up to 27,69% in the resistant and 24,97% in the susceptible. Hydrocarbons (less polar compounds) in the epicuticular wax can cause higher difficulty for glyphosate absorption (polar herbicide). When comparing the polarity of the epicuticular wax of the italian ryegrass biotypes, it was verified that both in the resistant biotype as in the susceptible the epicuticular wax presented more than 50% of polar compounds (alcohols and aldehydes) in its constitution, being that value equal to 69,80% in the resistant biotype and 64,94% in the susceptible. Through that presented characterization, it can be affirmed that small differences exist in the epicuticular wax of resistant and susceptible to the glyphosate italian ryegrass; the resistant biotype presented polarity degree a little superior to the susceptible biotype, however that difference cannot be considered outstanding to the point of determining larger or smaller tolerance of a biotype or other to the herbicide glyphosate.

Keywords: glyphosate, resistance, chromatography, *Lolium multiflorum*.

INTRODUÇÃO

O azevém é uma planta anual herbácea, sendo considerada importante planta daninha em culturas anuais e perenes na Região Sul do Brasil, mas pode ser controlada facilmente (Roman et al., 2004; Vargas et al., 2005). Em decorrência do uso indiscriminado e repetitivo do glyphosate para controle do azevém na referida região, promoveu-se a seleção de biótipos resistentes a esse herbicida (Vargas et al., 2005) tornando o manejo desta planta extremamente difícil. Com o intuito de buscar alternativas para esse novo problema, foi necessário realizar estudos básicos sobre a biologia, fisiologia, química e capacidade competitiva e entre esses diferentes biótipos de azevém suscetível e resistente ao glyphosate. A penetração de herbicidas pode ocorrer nas plantas pelas suas estruturas aéreas, como folhas, caules, flores e frutos, e pelas estruturas subterrâneas como raízes, rizomas, tubérculos, bem como pelas sementes e, durante a germinação e a emergência, pela radícula e pelo caulículo (Silva et al., 2007). No entanto, são as folhas o principal órgão das plantas daninhas envolvido na penetração de herbicidas aplicados em pós-emergência, pois a maior parte dos herbicidas comercializados atualmente é aplicada em pós emergência da planta daninha (Procópio et al., 2003). A composição química do revestimento cuticular é variada, sendo a cutina e a cera seus principais componentes. A cutina é um biopoliéster insolúvel, de elevado grau de entrecruzamento

entre os ácidos graxos hidroxilados de cadeia longa que a compõem, enquanto a cera apresenta-se embebida nesse polímero ou depositada no exterior da cutícula (epicuticular) A cera epicuticular pode ser depositada em uma variedade de formas físicas: em algumas plantas, formam camadas finas; em outras, podem formar placas ou cristais de diferentes tamanhos e formas. Devido à sua composição química, refletida no grau de cristandade e à possibilidade de constituir na superfície da membrana cuticular uma película que atua como interfase entre a célula vegetal e o meio, a cera se destaca como a principal barreira protetora contra as perdas de água por transpiração excessiva, a ação de patógenos, as radiações solares e a entrada de produtos químicos e contaminantes (Heredia et al., 1998) Dependendo da composição e da polaridade da cera e do herbicida, a cera epicuticular pode se tornar uma barreira à penetração de herbicidas. A quantidade e a composição da cera epicuticular podem variar com a espécie, com o cultivar e até mesmo dentro da mesma população. As diferenças dependem, também, das condições climáticas, do organismo estudado e da fenologia da planta. A cera epicuticular é uma mistura complexa de diferentes compostos alifáticos. Normalmente, esses compostos contêm séries homólogas de alcanos, álcoois (primários e secundários), aldeídos, ácidos, cetonas, β-dicetonas e ésteres (Bianchi & Bianchi, 1990). Objetivou-se com este trabalho determinar a composição química da cera epicuticular dos biótipos de azevém resistente e sensível ao glyphosate

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura controlada, em vasos contendo 200 mL de substrato, composto de Argissolo Vermelho-Amarelo adubado. Em cada vaso foram semeadas dez sementes de azevém, procedendo-se ao desbaste, mantendo duas plantas por vaso O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dez repetições. As folhas foram coletadas 30 dias após emergência e a cera epicuticular foi extraída da primeira folha com lígula totalmente visível, utilizando-se o método de Hamilton (1995), com modificações Para isso, uma folha de cada repetição foi introduzida, separadamente, em placa de Petri com 100 mL de clorofórmio por 30 segundos, agitando-se levemente. Esse procedimento foi realizado cuidadosamente, para se evitar a ruptura das folhas e a consequente liberação dos compostos celulares. Os extratos obtidos foram filtrados com papel-filtro e transferidos para um béquer, onde foram evaporados em banho-maria, até reduzir o volume para, aproximadamente, 15 mL. Esta solução (clorofórmio mais cera) foi transferida para tubos de ensaio de 25 mL, de peso conhecido. O clorofórmio foi evaporado em banho-maria, para obtenção do resíduo sólido (cera). A quantificação da cera foi expressa pela quantidade de cera por unidade de área foliar (mg cm^{-2}). Para determinação da área das folhas de cada cultivar, utilizada para extração da cera, foi usado aparelho fotoelétrico de medição de área foliar ("T Delta-T Devices). As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Cada amostra foi submetida à análise em espectrômetro de infravermelho,

registrado entre 4.000 e 500 cm^{-1} . As análises cromatográficas foram realizadas em aparelho GC-MS PQ 5050A (Shimadzu), utilizando-se coluna capilar DB-1 (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 μm) e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 290 °C, com temperatura inicial de 80 °C, por cinco minutos, aumentando de 80 a 285 °C na razão de 4 °C por minuto. A temperatura final permaneceu em 285 °C por 40 minutos. A temperatura do detector foi de 290 °C, e a da interface do sistema CG-EM, de 290 °C. O detector de massas operou com ionização de chama por impacto de elétrons (70 ev) e varredura de massas de 30 a 600 Da. Foi injetado 1 μL de cada amostra, e a identificação dos compostos foi feita por meio de comparação dos espectros de massas das amostras com aqueles existentes no banco de dados (Wiley 229.000). Os dados referentes à quantidade de cera epicuticular foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na análise dos grupos de compostos químicos utilizaram-se médias observadas e desvios-padrão

.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de cera epicuticular extraída (Figura 1) foi maior nas folhas do biótipo de azevém suscetível (16,20 $\mu\text{g cm}^{-2}$), todavia sem diferir do biótipo resistente (14,90 $\mu\text{g cm}^{-2}$). A quantidade de ceras epicuticulares na maioria das espécies varia de 10 a 200 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (McWhorter & Ouzts, 1993), embora quantidades acima de 300 $\mu\text{g cm}^{-2}$ já tenham sido relatadas (Baker, 1982). Ferreira et al. (2005), trabalhando com cinco genótipos de cana-de-açúcar, observaram que tais valores variavam de 16,26 a 23,22 $\mu\text{g cm}^{-2}$, sem nenhuma relação com o grau de tolerância a herbicidas dos genótipos com a quantidade de cera. Monquero et al. (2004) observaram em *Ipomea grandifolia* 37,0 $\mu\text{g cm}^{-2}$ de cera epicuticular, seguida por *Commelina benghalensis* (34,5 $\mu\text{g cm}^{-2}$) e *Amarantus hybridus* (31,7 $\mu\text{g cm}^{-2}$) também sem relação com absorção de herbicidas. Holloway (1970), Hodgson (1973) e al-Jaff-Jaff et al. (1982) afirmam não existir correlação entre quantidade de cera epicuticular e absorção de herbicidas. A cera epicuticular de cada material avaliado foi submetida à análise espectroscópica na região do infravermelho e caracterizada como uma mistura de compostos de cadeia curta. Essas observações são indicadas pelas bandas em 3.500-3.200 cm^{-2} (deformação de O-H), 2.910 e 2.810 cm^{-1} (deformação de CH_2 e CH_3), uma banda fica em 1.732 cm^{-1} (deformação C=O de éster), 1.412-1.402 cm^{-1} (deformação C-H) e 720 cm^{-1} (deformação de $[\text{CH}_2]_n$, $n>4$) (Figura 2) Os compostos orgânicos presentes na mistura foram identificados por, comparação com aqueles contidos na biblioteca do aparelho (Wiley 229 000). Os compostos identificados estão relacionados na Tabela 1.

Nas amostras submetidas à espectrometria de massas foram encontrados de 20 a 40 constituintes nos dois biótipos de azevém avaliados, quando submetidos à cromatografia gasosa. No entanto, ao serem submetidos à espectrometria de massa, optou-se por identificar aqueles com porcentagem igual ou superior a 1,60%, sendo considerados, dessa forma, de 10 a 16 picos (Tabela 1). Como pode ser observado na tabela 1, quatro compostos nos biótipos resistente e suscetível não puderam ser identificados. Os componentes enicosano, octadecanal e octadecano foram observados apenas no

biótipo resistente de azevém, e o composto tricosano foi observado somente no biótipo suscetível. Os componentes tridecanal, hexacosan-1-ol, hexadecanal, pentacosano e octacosano foram encontrados nos dois biótipos avaliados (Tabela 1). Os grupos de compostos observados na cera epicuticular dos dois biótipos foram álcoois, aldeídos e hidrocarbonetos (Figura 2). Os hidrocarbonetos são os componentes menos polares (mais hidrofóbicos) encontrados na cera epicuticular dos dois biótipos de azevém. É conhecido o fato de que há interação bastante complexa entre a natureza química do produto aplicado e a superfície foliar. Há dois tipos principais de superfícies: uma facilmente molhável (rica em álcoois) e outra de molhamento mais difícil (rica em alcanos) As características da solução aplicada, a polaridade do composto, a tensão superficial da calda etc. são importantes nessa interação (Silva et al., 2007). De acordo com Herédia et al. (1998) o que define a maior absorção de herbicidas pelas folhas das plantas é a composição da cera epicuticular. Herbicidas polares tendem a penetrar com maior facilidade em plantas onde as folhas apresentam constituição química da cera mais polar; neste caso a cera epicuticular se hidrata com maior facilidade. Da mesma forma, herbicidas pouco polares penetram com maior facilidade em folhas que apresentam ceras formadas por compostos menos polares (hidrofóbicos). O composto observado em maior proporção nos biótipos resistente e suscetível de azevém foi o hexacosan-1-ol (46,80% no biótipo resistente e 52,20% no biótipo suscetível) (Tabela 1), sendo os álcoois os compostos mais abundantes observados na cera epicuticular dos biótipos de azevém, representados por apenas este composto, já mencionado. Aldeídos e álcoois são compostos polares de alta molhabilidade, o que facilita a penetração dos herbicidas polares como o glyphosate (McWorter & Ouzts, 1993). De modo geral, os álcoois são mais polares (hidrofílicos) que os hidrocarbonetos, outro grupo de compostos encontrados na cera epicuticular dos biótipos de azevém. Os hidrocarbonetos foram encontrados em maior proporção no biótipo resistente de azevém, chegando a 27,69% neste e 24,97% no biótipo suscetível (Tabela 2). Essa maior proporção de hidrocarbonetos (pouco polares) na cera epicuticular do biótipo resistente pode conferir a este maior dificuldade de absorção do glyphosate (polar); entretanto, Ferreira et al. (2006), trabalhando com ^{14}C glyphosate, não observaram diferenças marcantes entre os dois biótipos de azevém com relação à absorção do herbicida. Segundo Hamilton (1995), os hidrocarbonetos estão presentes em quase toda a superfície lipídica das plantas, variando quantitativamente de traços até 50 % da quantidade total, mas são predominantes em poucos casos. De acordo com Chachalis et al. (2001), os hidrocarbonetos de cadeia longa são menos polares que álcoois e ésteres. Monquero et al. (2004), trabalhando com as plantas daninhas *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*, observaram que *C. benghalensis*, que possui maior tolerância ao glyphosate, apresentou maior proporção de hidrocarbonetos na cera epicuticular, altamente hidrofóbicos (pouco polares), contrariando a polaridade do glyphosate, que é altamente hidrofílico (polar) (Sandberg et al., 1980). Ferreira et al. (2005), avaliando cinco genótipos de

cana-de-açúcar, constataram que a proporção deste composto na cera epicuticular variou de 5,76% a 18,16%, todavia sem nenhuma relação com absorção da mistura herbicida trifloxysulfuron + ametryn. Monquero et al. (2004) observaram que em *C. Benghalensis* as ceras apresentaram em sua constituição química maior quantidade de hidrocarbonos (n-alcenos) em comparação com as espécies *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*, constatando, dessa forma, relação entre composição da cera epicuticular e absorção do glyphosate. Ao se comparar a polaridade da cera epicuticular dos biótipos de azevém, constatou-se que tanto no biótipo resistente quanto no suscetível, a cera epicuticular apresentou mais de 50% de componentes polares (álcoois e aldeídos) em sua constituição, sendo esse valor igual a 69,80% no biótipo resistente e 64,94% no suscetível (Tabela 3). Informações referentes à polaridade da cera epicuticular estão disponíveis para várias espécies de plantas daninhas, sendo bastante variadas. Como exemplo, pode-se citar *Cyperus rotundus*, que apresenta em sua constituição cerca de 82% de compostos não-polares, enquanto *Sorghum halepense* apresenta cerca de 6% de compostos polares e 93% da constituição química da sua cera epicuticular representados por compostos não-polares (Silva et al., 2007). Por meio dessa caracterização apresentada, pode-se afirmar que existem pequenas diferenças na cera epicuticular dos biótipos de azevém resistente e suscetível ao glyphosate; o biótipo resistente apresentou grau de polaridade um pouco superior ao do biótipo suscetível, porém essa diferença não pode ser considerada marcante a ponto de determinar o maior ou menor grau de resistência de um biótipo ou outro ao herbicida glyphosate

LITERATURA CITADA

AI-JAFF, D. M. A.; COOK, G. T.; CARR, K. E.; DUNCAN, H. J. Further studies on bracken morphology in relation to herbicide uptake. Pag 293-301 *in*: CUTLER, D. F.; ALVIN, K. L.; PRICE, C. E., (eds) **The plant cuticle**. Linnean Society Symposium Series 10. London: Academic Press, 1982.

BAKER, E. A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. Pag 139-166 *in*: CUTLER, D. F.; ALVIN, K. L.; PRICE, C. E., (eds) **The plant cuticle**. Linnean Society Symposium Series 10. London: Academic Press, 1982.

BIANCHI, A.; BIANCHI, G. Surface lipid composition of C₃ and C₄ plants. **Biochem. Syst Ecol.**, v. 18, p 533-537, 1990.

CHACHALIS, C. et al. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpet creeper with glyphosate **Weed Sci.**, v. 49, p. 156-163, 2001.

FERREIRA, E. A. et al. Glyphosate translocation in Italian ryegrass biotypes (*Lolium multiflorum*) **Planta Daninha**, v 24, p. 365-370, 2006.

FERREIRA, E. A. et al. Sensibilidade de cultivares e clones de cana-de-açúcar à mistura trifloxysulfuron-sodium + ametryn **Planta Daninha**, v. 23, n 1, p. 93-99, 2005.

HAMILTON, R. J. **Waxes**: chemistry, molecular biology and functions. Edinburgh: Orly Press, 1995 149 p.

HEREDIA, A et al La cutícula vegetal: estructura y funciones. **Ecologia**, v 12, p. 293-305, 1998.

HODGSON, J. M. Lipid deposition on leaves of *Canada thistle* ecotypes **Weed Sci.** 21:169-172. 1973

HOLLOWAY, P. J. Surface factors affecting the wetting of teaves. *Pestic. Sci.* v. 1, p:156-163, 1973

McWHORTER, C. G.; OUZTS, C. Leaf surface morphology of *Erythroxyllum* sp and droplet spread **Weed Sci.**, v 12, p 293-305,1993.

MONQUERO, P A. et al. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta Daninha**, v. **22**, p. 203-210, 2004.

PROCÓPIO, S. O. et al. **Anatomia foliar de plantas daninhas do Brasil**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003 a. v. 1. 118 p.

ROMAN, E. S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M. A.; MATTEI, R. W. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 301-306, 2004.

SANDBERG, C. L. et al. Absorption, translocation and metabolism of ¹⁴C-glyphosate in several weed species. **Weed Res.**, v. 20, p. 195-200, 1980.

SILVA, A. A. et al. **Biologia de Plantas Daninhas**. Editora UFV, 2007. 300 p.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S.; RIZZARDI, M. A.; SILVA, V. C. et al. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate **Planta daninha**, v.23, p. 153-160, 2005.

MONQUERO, P. A. et al. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta daninha**, v. 22, n. 2, 2004.

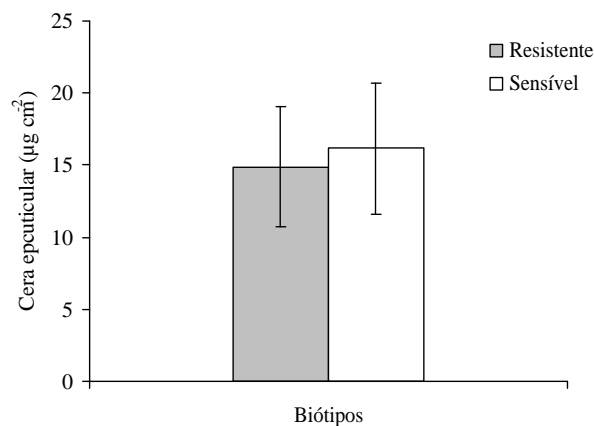


Figura 1. Cera epicuticular (µg cm⁻²) nos biótipos de azevém resistente e sensível ao glyphosate. As barras representam o desvio padrão.

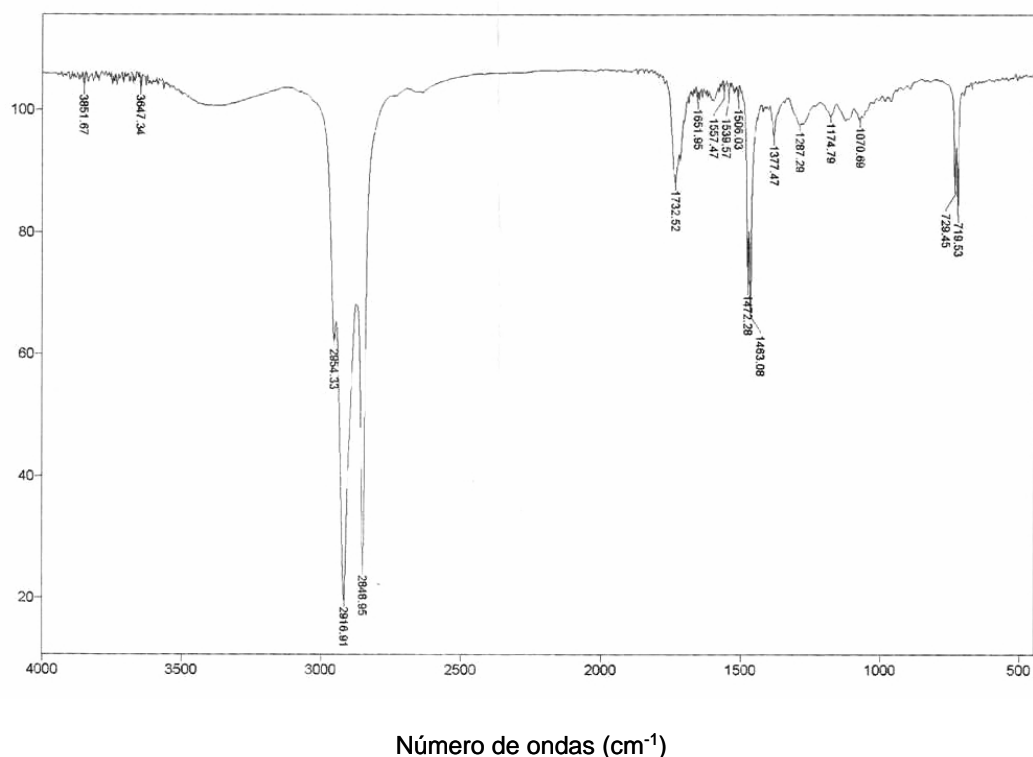


Figura 2. Espectro no infravermelho (NaCl) da fração da amostra da cera epicuticular do biótipo de azevém resistente glyphosate.

Tabela 1. Composição química (%) de cera epicuticular das folhas dos biótipos de azevém resistente e suscetível ao glyphosate

TR (minutos)	COMPOSTOS	BIÓTIPOS DE AZEVÉM	
		Resistente	Suscetível
		-----%-----	
56,21	Icosano	-	1,96
57,81	NI	-	1,88
58,81	Enicosano	1,58	-
59,61	Docosano	-	2,23
61,25	NI	1,60	1,90
62,08	Tridecanal	8,92	10,83
62,65	Tricosano	-	1,88
63,84	Hexacosan-1 -ol	46,80	52,20
65,46	Tetracosano	1,69	1,92
65,45	NI	1,62	1,93
67,48	Hexadecanal	6,65	1,91
68,16	Pentacosano	15,42	13,18
70,90	NI	-	4,67
73,49	Octacosano	5,91	3,80
71,53	Octadecanal	6,68	-
77,90	Octadecano	3,09	-

NI - compostos não identificados; TR - tempo de retenção.

Tabela 2. Grupos de compostos (%) e desvios-padrão dos grupos de compostos encontrados na cera epicuticular das folhas dos biótipos de azevém resistente e suscetível ao glyphosate

COMPOSIÇÃO	BIÓTIPO RESISTENTE	BIÓTIPO SUSCETÍVEL
	-----%-----	
Hidrocarbonetos	27,69 ±11,0	24,97 ±10,0
Aldeídos	22,25 ± 10,0	12,74 ± 5,0
Álcoois	46,80 ±17,0	52,20 ± 23,0
NI	3,22 ± 3,0	10,38 ± 5,0

NI - Compostos não identificados

Tabela 3. Porcentagem de compostos polares e pouco polares encontrados na cera epicuticular das folhas dos biótipos de azevém resistente e suscetível ao glyphosate

COMPONENTES	BIÓTIPO RESISTENTE	BIÓTIPO SUSCETÍVEL
	-----%-----	
Polares	69,80	64,94
Pouco polares	27,69	24,97