

## FERRAMENTA METABÓLICA PARA DIAGNÓSTICO DE PLANTAS EXPOSTAS AO HERBICIDA GLYPHOSATE

GOMES, G. L. G. C. (FCA – UNESP, Botucatu/SP – giovanna.gomes@fca.unesp.br); VELINI, E.D. (FCA – UNESP, Botucatu/SP – velini@fca.unesp.br); CARBONARI, C. A. (FCA – UNESP, Botucatu/SP – carbonari@fca.unesp.br); TRINDADE, M.L. B. (Bioativa, Botucatu/SP – mlbtrindade@uol.com.br).

**RESUMO:** O objetivo do estudo foi analisar o acúmulo dos ácidos chiquímico e quínico em plantas de milho após a aplicação de glyphosate.. Os tratamentos foram constituídos de duas doses do herbicida glyphosate: 72 g e.a. ha<sup>-1</sup> 720 g e.a. ha<sup>-1</sup>; e uma testemunha sem aplicação. A coleta das amostras foram realizadas aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA). Foi realizada a extração dos compostos a partir das amostras secas e moídas e a quantificação foi realizada por LC-MS/MS. Foram verificadas altas concentrações dos ácidos chiquímico e quínico nos tecidos das plantas de milho que receberam a dose de 720 g e.a. ha<sup>-1</sup>, de até 23 e 15 vezes maiores do que as encontradas nas plantas testemunhas, respectivamente. Desta forma, pode-se concluir que os ácidos chiquímico e quínico são bom indicadores da ação do glyphosate nas plantas, podendo serem utilizados como uma ferramenta metabólica de diagnóstico de plantas expostas à este herbicida.

**Palavras-chave:** ácido chiquímico, ácido quínico,

### INTRODUÇÃO

Uma das principais alterações metabólicas causadas nas plantas decorrente da aplicação ou pela deriva do glyphosate nas plantas é o acúmulo do ácido chiquímico, sendo utilizado como um indicador da intoxicação das plantas pelo glyphosate. Similarmente ao ácido chiquímico, o ácido quínico também pode acumular nos tecidos das plantas após a aplicação do glyphosate, e pode ser um composto reserva da via do ácido chiquímico, mas seu papel fisiológico ainda não está completamente esclarecido. Dessa forma, esses dois compostos podem ser utilizados como uma ferramenta metabólica no diagnóstico de plantas

expostas ao herbicida glyphosate. Portanto, o objetivo do estudo foi analisar o acúmulo dos ácidos chiquímico e quínico em plantas de milho após a aplicação de glyphosate.

## MATERIAL E MÉTODOS

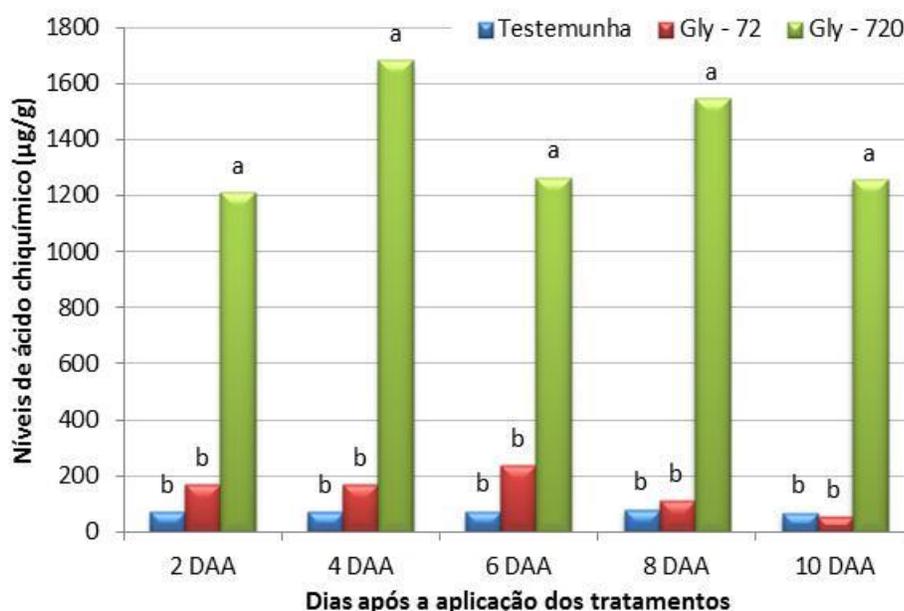
O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP campus de Botucatu/SP. O híbrido de milho utilizado foi o Pioneer 30F53, cultivado em vasos contendo 1 litro do substrato Bioplant. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições, duas doses do herbicida glyphosate: 72 g e.a. ha<sup>-1</sup> e 720 g e.a. ha<sup>-1</sup>; e uma testemunha sem aplicação. Aos 23 dias após a semeadura, foi realizada a aplicação dos tratamentos, utilizando-se um pulverizador estacionário, com uma barra equipada com quatro pontas XR 11002 VS, espaçadas em 0,5 m entre si, e dispostas a 0,5 m de altura em relação às plantas de milho. A pressão de trabalho utilizada pelo equipamento foi de 2,0 kgf cm<sup>-2</sup>, com velocidade de 3,6 km h<sup>-1</sup> e consumo de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>. O produto comercial utilizado para o preparo da calda de pulverização foi o Roundup Original (360 g e.a. L<sup>-1</sup>).

Foram realizadas cinco coletas de todas as folhas de quatro plantas por tratamento (repetições), aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA). As folhas das plantas coletadas foram lavadas para total remoção dos resíduos do glyphosate e fosfito, que permaneceram sobre a cutícula das folhas de milho. Após a lavagem, as folhas foram acondicionadas em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar, a 45°C por 72 horas e posteriormente foram moídas em moinho. Após as amostras serem moídas, pesou-se cerca de 100 mg da amostra seca, que foram acondicionadas em tubos “falcon” de 15 mL de capacidade. Foi adicionado no tubo contendo a amostra, 10 mL de água acidificada a pH 2,5. Os tubos foram agitados para que a amostra seca fosse misturada com a água e submetidos a banho de ultra-som durante 30 minutos. Na sequência, foram centrifugados e o sobrenadante coletado, filtrado e acondicionado em vial para análise dos seguintes compostos: ácido chiquímico e ácido quínico. Para a realização das análises foi utilizado um sistema LC-MS/MS, composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) acoplado a um espectrômetro de massas (3200 QTRAP), no modo triplo quadrupolo. O modo de ionização utilizado foi o negativo e as condições cromatográficas foram: coluna analítica Gemini 5 µ C18 110 Å (150mm x 4,6mm), fluxo de 0,500 ml min<sup>-1</sup>, no modo gradiente com fase A composta por 5 mM acetato de amônio em água e fase B composta por 5 mM acetato de amônio em metanol.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

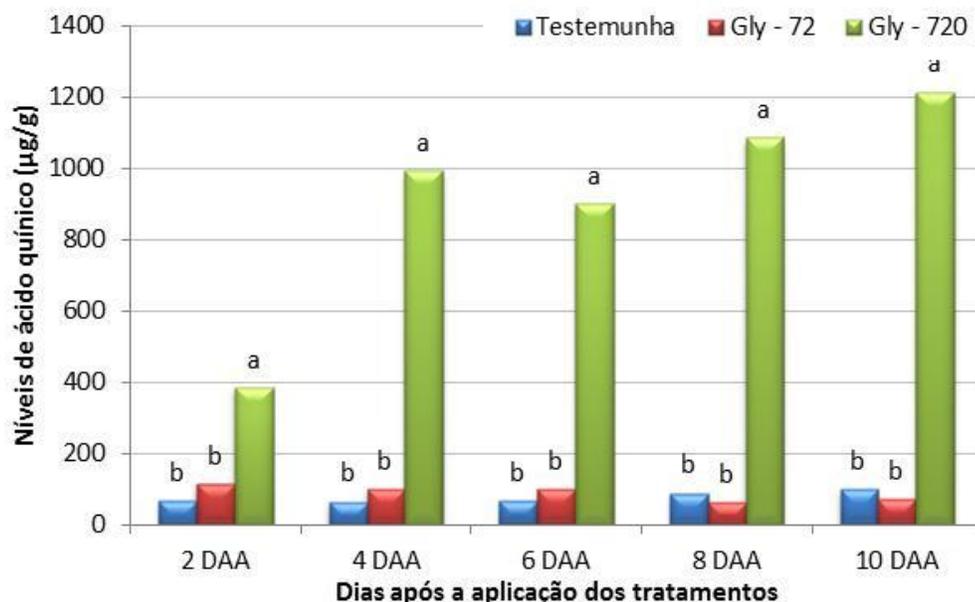
Nas Figuras 1 e 2 estão apresentados os resultados dos níveis dos ácidos chiquímico e quínico nas plantas de milho após a aplicação de glyphosate, respectivamente. Para o ácido chiquímico foram observados níveis de até 23 vezes maiores nas plantas tratadas com a maior dose de glyphosate em comparação com a testemunha, aos 4 dias após a aplicação. Quando foi aplicada a menor dose, não foram observadas diferenças significativas em relação à testemunha, no entanto aos 6 dias após a aplicação foram observados níveis aproximadamente 3 vezes maior do que a testemunha (Figura 1).

Diversos autores puderam correlacionar a intoxicação das plantas pelo glyphosate com o acúmulo do ácido chiquímico (Reddy et al., 2010; Orcaray et al., 2010; Matallo et al., 2009; Petersen et al., 2007; María et al., 2006; Haring et al., 1998).



**Figura 1.** Níveis de ácido chiquímico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas plantas de milho após a aplicação dos tratamentos. Botucatu/SP, 2012.

Os mesmos efeitos relatados para o ácido chiquímico são encontrados para o ácido quínico, embora em níveis um pouco menores. Aos 4 DAA são observados níveis de ácido quínico 15 vezes maiores nas plantas tratadas com a maior dose de glyphosate quando comparadas com a testemunha.



**Figura 2.** Níveis de ácido quínico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas plantas de milho após a aplicação dos tratamentos. Botucatu/SP, 2012.

Segundo Orcaray et al. (2010), o ácido quínico pode ser um composto reserva da via do ácido chiquímico, mas seu papel fisiológico ainda não está completamente esclarecido. Em estudo realizado pelos mesmos autores, foi observado acúmulo de ácido quínico em folhas de ervilha tratadas com os herbicidas imazethapyr, chlorsulfuron e glyphosate, 2,4; 1,6 e 1,4 vezes, respectivamente, comparados com a testemunha, aos 15 dias após os tratamentos.

## CONCLUSÕES

Foram verificadas altas concentrações dos ácidos chiquímico e quínico nos tecidos das plantas de milho que receberam a dose de 720 g e.a.  $\text{ha}^{-1}$ , de até 23 e 15 vezes maiores do que as encontradas nas plantas testemunhas, respectivamente. Desta forma, pode-se concluir que os ácidos chiquímico e quínico são bom indicadores da ação do glyphosate nas plantas, podendo serem utilizados como uma ferramenta metabólica de diagnóstico de plantas expostas à este herbicida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HARRING, T., STREIBIG, J. C., AND HUSTED, S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.4406-4412, 1998.
- MARÍA, N.; BECERRIL, J. M.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; HERNÁNDEZ, A.; FELIPE, M. R.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: role of shikimate accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.2621-2628, 2006.
- MATALLO, M. B. et al. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. *Planta Daninha*, v. 27, n. especial, p. 987-994, 2009.
- ORCARAY, L.; IGAL, M.; MARINO, D.; ZABALZA, A.; ROYUELA, M. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science*, v.66, p.262–269, 2010.
- PETERSEN, I. L.; HANSEN, H. C. B.; RAVN, H. W.; SORENSEN, J. C.; SORENSEN, H. Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.89, p.220–229, 2007.
- REDDY, K. N.; BELLALOU, N.; ZABLOTOWICZ, R. M. Glyphosate effect on shikimate, nitrate reductase activity, yield, and seed composition in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.3646–3650, 2010.