

SUBDOSES DE GLYPHOSATE COMO FERRAMENTA NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CHIQUÍMICO POR *Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc

FRANCO, D. A. S. (Instituto Biológico, Campinas/SP – franco@biologico.sp.gov.br), ALMEIDA, S. D. B. (Instituto Biológico, Campinas/SP – almeida.sdb@biologico.sp.gov.br), MOURA, M. A. M. (Instituto Biológico, Campinas/SP - monica_moura@biologico.sp.gov.br), BOTTEON, J. E. (Instituto Biológico, Campinas/SP – bottler@hotmail.com), CERDEIRA, A. L. (Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP - antonio.cerdeira@embrapa.br), QUEIRÓS, S. C. N. (Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP - sonia.queiros@embrapa.br), MATALLO, M. B.* (Instituto Biológico, Campinas/SP – matallo@biologico.sp.gov.br).

RESUMO: Periodicamente a humanidade é assolada por pandemias de gripe com consequências fatais. Dessa forma, o desenvolvimento de medidas eficazes para combater as viroses são de crucial importância para a saúde humana. O fosfato de oseltamivir é um potente inibidor viral produzido a partir do ácido chiquímico e extraído da semente de *Illicium verum* sua mais importante fonte natural. Tendo como sítio de ação a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), glyphosate é o único composto capaz de inibir a sua atividade com o consequente acúmulo do ácido chiquímico pelos vegetais. Plantas de *B. plantaginea* foram pulverizadas com subdoses de glyphosate determinando-se o teor de ácido chiquímico na massa seca dessas plantas por HPLC aos 0, 3, 6, 9 e 12 dias após aplicação do herbicida. Os resultados mostraram que a aplicação de 36 g.ha⁻¹ de equivalente ácido de glyphosate produziu quantidades significativamente superiores de ácido chiquímico quando comparada com os demais tratamentos nas diferentes épocas de amostragem, alcançando um máximo de concentração 6 dias após sua aplicação nas plantas de *B. plantaginea*, evidenciando o potencial dessa planta como fonte de ácido chiquímico para a produção de fosfato de oseltamivir quando tratada com esse herbicida.

Palavras-chave: Tamiflu; influenza; HPLC.

INTRODUÇÃO

Muito mais agressiva, com rápida deterioração clínica e uma taxa de letalidade superior a 50%, a gripe aviária causada pelo vírus H5N1 tem despertado crescente preocupação devido a possibilidade do vírus mutante adquirir habilidade de infecção entre a espécie humana (RAWAT, 2013). Atualmente não existe vacina que imunize totalmente os seres humanos contra o vírus H5N1. O fosfato de oseltamivir, produzido a partir do ácido chiquímico é comercializado pela ROCHE sob o nome comercial de TAMIFLU® contra

diversos *strains* de vírus influenza, incluindo o H1N1 e H5N1, sendo considerado como o mais eficiente tratamento contra a gripe aviária (KRAMER et al., 2003). O ácido chiquímico é uma substância química escassa e de alto custo, obtida principalmente a partir de sementes de *Ilicium verum*, um arbusto nativo da China popularmente conhecido como estrela chinesa, e *I. anisatum* nativo do Japão (SADAKA & GARCIA, 1999). Segundo BRADLEY (2005) a produção anual de ácido chiquímico é insuficiente para produzir a quantidade de Tamiflu® necessário no caso de uma pandemia. Existe, portanto, a necessidade urgente da produção de grandes quantidades de ácido chiquímico a partir de fontes diferentes do *Ilicium* spp.. Originária provavelmente da África, *Brachiaria plantaginea*, é uma gramínea de ciclo anual, comum no Brasil, onde é cultivada para forragem verde, produzindo um rápido crescimento de primavera, permitindo até três cortes por ciclo (KISSMANN & GROTH, 1993). Suas características fenotípicas aliadas às exigências edafoclimáticas permitem seu cultivo praticamente em todo o território nacional.

Tendo como sítio de ação a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), glyphosate é o único composto capaz de inibir a sua atividade com o conseqüente acúmulo do ácido chiquímico nas plantas e microorganismos (HENRY et al., 2005). De caráter transitório, o acúmulo do ácido chiquímico tem sido reportado ocorrer um dia após a aplicação de glyphosate, alcançando picos de concentração entre 4 e 7 dias após (KOGER et al. 2005).

Baseado na hipótese de que *B. plantaginea* possa ser uma fonte potencial de ácido, chiquímico, o objetivo desse trabalho foi verificar se aplicações de subdoses de glyphosate irão induzir o acúmulo desse ácido em plantas dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido pelo Laboratório das Ciências das Plantas Daninhas (LCPD) do Centro Experimental do Instituto Biológico (CEIB) situado em Campinas, SP durante o ano de 2013. Sementes de *B. plantaginea* (capim marmelada) foram semeadas em vasos plásticos de 4 L de capacidade (11/11/13), preenchidos com solo de textura média e vermiculita (2:1), completando-se o volume com substrato orgânico, sendo mantidos em casa de vegetação com irrigação automática por aspersão. Após a emergência (04/12/13) foi efetuado o desbaste, deixando-se cinco plântulas por vaso. Aos 31 dias após a emergência, ao atingirem 5 perfilhos (média de 7 folhas com 99,6 cm de comprimento,) as plantas foram pulverizadas com glyphosate a 0,0 (testemunha), 0,1, 0,01 e 0,001 L.ha⁻¹ da marca comercial Roundup Original utilizando um pulverizador costal a pressão constante mantida por CO₂ pressurizado. Imediatamente antes da aplicação dos tratamentos (branco) e 3, 6, 9 e 12 dias após (DAT), as folhas foram colhidas e submetidas ao processo de

extração determinando-se a concentração de ácido chiquímico por HPLC, de acordo método desenvolvido por MATALLO et al. 2009. O experimento foi conduzido no esquema fatorial combinando os fatores doses do herbicida com diferentes épocas de coleta das folhas, com o fator doses ocorrendo em 4 níveis (0,0; 0,1, 0,01 e 0,001 L.ha⁻¹ de Roundup Original) e o fator época também em 4 níveis. (3, 6, 9 e 12 DAT). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram inicialmente testados quanto à normalidade e homogeneidade da variância e logo submetidos à análise pelo teste F. Foi utilizado o teste de Holm-Sidak para comparações entre as médias ($p \leq 0,05$) no caso de diferença significativa entre os tratamentos. Utilizou-se o programa Sigma Plot com o ajuste dos dados feito com o programa Curve Expert.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificada interação significativa entre as doses de glyphosate e as épocas de amostragem das folhas ($p < 0,001$) indicando que a aplicação de subdoses de glyphosate provocou um acúmulo na concentração de ácido chiquímico nas folhas de *B. plantaginea* (Figura 1).

Os períodos de máximo acúmulo de ácido chiquímico encontrados estão de acordo com aqueles relatados por HENRY et al. (2005) que verificaram picos de concentração aos 4 e 7 dias após aplicação de glyphosate em milho e soja, respectivamente. As concentrações endógenas de ácido chiquímico nas plantas testemunha e na amostra em branco estão próximos àquelas determinadas em acículas de *Pinus* spp. e sementes de *Liquidambar styraciflua* (MARTIN et al. 2010). Diferentes mecanismos explicam a ação de glyphosate. Sabe-se que a inibição competitiva da EPSPS pelo glyphosate resulta no acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos das plantas (BRESNAHAN et al. 2003).

A dependência entre a maior subdose de glyphosate (0,1 L.ha⁻¹) e a concentração de ácido chiquímico nas folhas de *B. plantaginea* é mostrada na Figura 2, verificando-se uma relação funcional não linear relativamente forte entre ambos, com o modelo Gaussiano explicando 66,7% da variabilidade na concentração do ácido chiquímico.

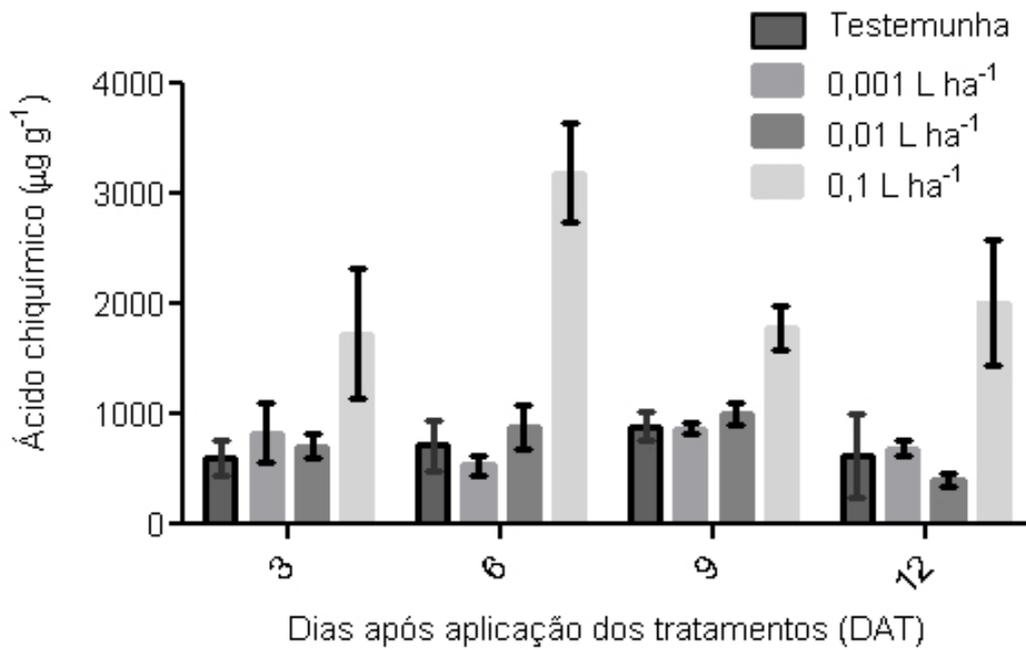


Figura 1. Concentração de ácido chiquímico em *B. plantaginea* aos 3, 6, 9 e 12 dias após a aplicação de subdoses de glyphosate.

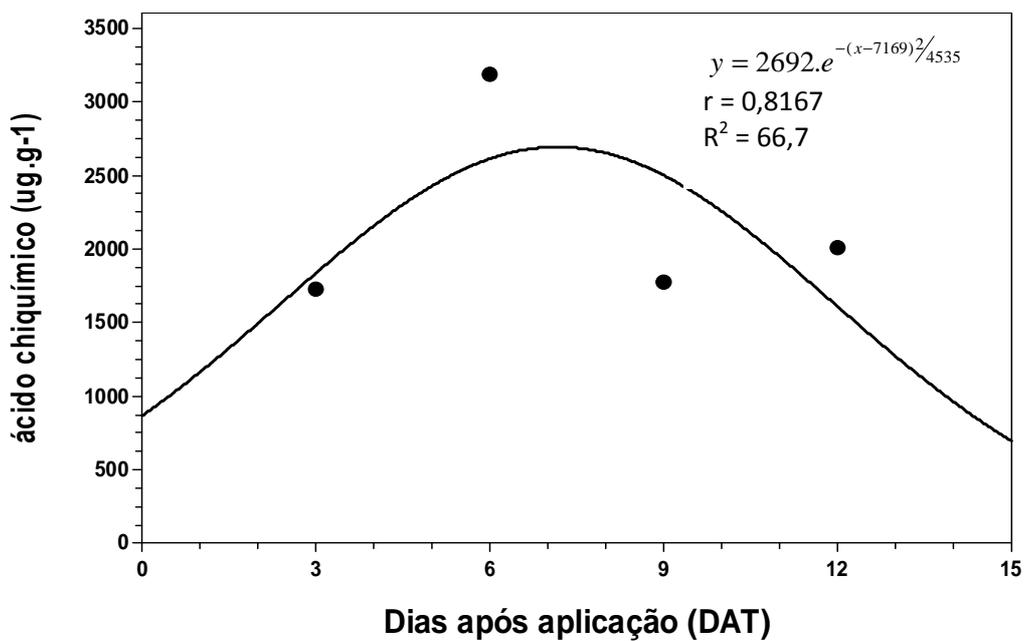


Figura 2: Curva de resposta da concentração de ácido chiquímico em *B. plantaginea* tratada com Roundup Original a 0,1 L.ha⁻¹.

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram acúmulo de ácido chiquímico na massa seca de *B. plantaginea* pulverizada com Roundup Original a 0,1 L.ha⁻¹, com aumentos de até 445% em relação às plantas não pulverizadas, com pico de concentração aos 6 DAT, confirmando o potencial dessa planta como fonte de ácido chiquímico.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de auxílio a pesquisa para a realização do projeto nº 471927/2013-9.

*Autor para correspondência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADLEY, D. Star role for bacteria in controlling flu epidemic? *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 945-946, 2005.

BRESNAHAN, G.A. *et. al.* Glyphosate Applied Preharvest Induces Shikimic Acid Accumulation in Hard Red Spring Wheat (*Triticum aestivum*). *J. Agric. Food Chem.*, 51:14, 4004-4007, 2003.

HENRY, W.B. *et. al.* Accumulation of Shikimate in Corn and Soybean Exposed to Various Rates of Glyphosate. *Crop Management. Plant Management Network*, 2005.

KISSMANN, K.G. & GROTH, D. *Plantas Infestantes e Nocivas* 2 ed. São Paulo: BASF, p.415-420, 1997.

KOGER, C.H. *et. al.* Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci.*, 53:438-445, 2005.

KRÄMER, M. *et. al.* Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabolic Engineering* 5:277-83, 2003.

MARTIN, E. *et. al.* Swwetgun (*Liquidambar styraciflua* L.): Extraction of Shikimic Acid Coupled to Dilute Acid Treatment. *Appl. Biochem.* 162: 1660-68, 2010.

MATALLO, M.B. *et. al.* Microwaved assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. *Planta Daninha* 27:987-994, Número Especial. 2009.

RAWAT, G. *et. al.* Expanding horizons of shikimic acid: Recent progress in production and its endless frontiers in application and market trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 4277-4287. 2013.

SADAKA, M., & GARCIA, A.. Extraction of shikimic and quinic acids. *Chem. Eng. Commun* 173: 91-102, 1999.