

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -
AGRONOMIA

**BIOMARCADORES DA AÇÃO DO GLYPHOSATE EM
PLANTAS *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.: UMA ESPÉCIE
NATIVA DO DOMÍNIO CERRADO**

Autora: Priscila Ferreira Batista

Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

Rio Verde - GO
Fevereiro – 2014

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-GRONOMIA

**BIOMARCADORES DA AÇÃO DO GLYPHOSATE EM
PLANTAS DE *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.: UMA ESPÉCIE
NATIVA DO DOMÍNIO CERRADO**

Autora: Priscila Ferreira Batista
Orientador: Dr. Alan Carlos Costa

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Juraci Alves de Oliveira
Avaliador externo
UFV/MG

Prof. Dr. Adriano Jakelaitis
Avaliador interno
IF Goiano/RV

Dra. Clarice Aparecida Megguer
Avaliadora interna
(Bolsista PNPd) IF Goiano/RV

Prof. Dr. Alan Carlos Costa
Presidente da banca/ Orientador
IF Goiano/RV

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -
AGRONOMIA

**BIOMARCADORES DA AÇÃO DO GLYPHOSATE EM
PLANTAS *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.: UMA ESPÉCIE
NATIVA DO DOMÍNIO CERRADO**

Autora: Priscila Ferreira Batista

Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia – área de concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Ciências Agrárias, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA.

Rio Verde - GO
Fevereiro - 2014

AGRADECIMENTO

A Deus, pela vida, sabedoria, força e mais esta importante vitória.

Aos meus amados pais, por serem minha maior escola, por todo amor, carinho, incentivo, confiança e apoio incondicional, sempre estando ao meu lado em tudo que escolhi e ser meu porto seguro.

À minha querida irmã, pelo seu amor incondicional e incentivo sempre.

A toda a minha família, pelo incentivo e carinho.

Ao meu orientador Professor Alan Carlos Costa, pela oportunidade, confiança, pelo exemplo de dedicação, apoio e ensinamento que muito contribuíram para a minha formação.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) – CTINFRA/PROINFA, pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

Ao meu Coorientador, Professor Adriano Jakelaitis, pelos ensinamentos científicos e colaboração nos experimentos, além das contribuições na banca examinadora.

À minha Coorientadora, Professora Clarice Aparecida Megguer, pela amizade, orientação, companheirismo, conselhos, pelos grandes ensinamentos e pelas contribuições na banca examinadora.

Ao Professor Juraci Alves de Oliveira da Universidade de Federal de Viçosa, pela participação e grandes contribuições na banca examinadora.

À minha amiga Júlien da Silva Lima, pela grande amizade, carinho, apoio, conselhos e ensinamentos.

A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Ecofisiologia - Vanessa, Sueisla, Fábria, Roberto, Danilo, Gabriel, Luciana, Ailton, Marília, Viviane, Raiane, Jonatas, Natália, Rodolfo, Gabriela, Marcio, Karen, Gilberto – pela enorme amizade, tornando minha família Rio-verdense, pelos agradáveis momentos que passamos juntos, pelas risadas, histórias, aprendizados, e dedicação nas análises realizadas. Estes momentos deixarão saudades!

Em especial, à minha amiga irmã Vanessa Camargo, pela confiança, lealdade, convivência, risadas, conselhos, amparo em todos os momentos, pois foi por meio do incentivo dela que conheci e me inscrevi no processo seletivo.

À minha amiga Fábria, pela disposição em ajudar em todos os momentos necessários para a execução desse trabalho.

À Aline Gobbi, que me acolheu em sua casa com muito carinho, assim que mudei para Rio Verde.

Às queridas amigas da república: Jailma, Marília, Vanessa, Viviane, Aline, Renata, Caroline e Maisa, pela convivência fraterna, momentos de grandes alegrias e amizade sempre.

Às secretárias Vanilda, Luceni e Karina, do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, pela amizade, dedicação, competência e profissionalismo que sempre empenham em seu trabalho.

A todos os colegas e amigos de pós-graduação e do Instituto Federal Goiano, pela amizade, companheirismo e pelo compartilhamento de conhecimentos.

A todos os professores do programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias-Agronomia, pelos ensinamentos repassados e dúvidas tiradas, durante minha jornada de acadêmica.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

BIOGRAFIA DA AUTORA

PRISCILA FERREIRA BATISTA, filha de Valteci Batista Teixeira e Celita Ferreira Anastácio Batista, nasceu no dia 02 de março de 1989, na cidade de Iporá, Goiás.

Em fevereiro de 2006, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Goiás Unidade de Iporá, graduando em dezembro de 2009.

Em janeiro de 2010, ingressou no curso de Especialização em Tecnologias Aplicadas ao Ensino de Biologia na Universidade Federal de Goiás, especializando-se em julho de 2011.

Em fevereiro de 2012, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias-Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus de Rio Verde, sob a orientação do Professor Alan Carlos Costa.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS ABREVIACÕES E UNIDADES	ix
RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
OBJETIVO	11
CAPÍTULO I.....	12
RESUMO	13
1. Introdução.....	14
2. Material e métodos	15
2.1. Material vegetal e as condições experimentais.....	155
2.2. Medições das trocas gasosas e do teor de clorofila	17
2.3. Medições da fluorescência da clorofila <i>a</i>	17
2.4. Análise estatística	17
3. Resultados.....	18
3.1 Variáveis microclimáticas	18
3.2. Trocas gasosas	18
3.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	20

3.4. Teor de clorofila	222
4. Discussão	233
5. Conclusões.....	266
6. Referências bibliográficas	266
CAPÍTULO II.....	31
RESUMO	32
1. Introdução.....	333
2. Material e métodos	344
2.1. Material vegetal e as condições experimentais.....	344
2.2. Sintomas visuais de toxicidade do glyphosate	35
2.3. Determinação dos teores de açúcares redutores, açúcares não redutores, açúcares solúveis totais e amido.....	35
2.3.1. Determinação dos teores de açúcares solúveis totais	35
2.3.2. Determinação dos teores de açúcares redutores	356
2.3.3. Determinação dos teores açúcares não redutores	366
2.3.4. Determinação dos teores amido.....	367
2.4. Medição da taxa respiratória.....	377
2.5. Determinação do teor de de ácido chiquímico	377
2.5.1. Extração	37
2.5.2. Determinação de ácido chiquímico	377
2.6. A análise estatística	38
3. Resultados.....	388
3.1. Sintomas visuais de toxicidade do glyphosate	388
3.2. Teores de açúcares e amido em plantas de <i>P. torta</i>	40
3.3. Taxa respiratória.....	40
3.4. Teor de ácido chiquímico em plantas de <i>P. torta</i>	411
4. Discussão	41
6. Conclusões.....	44
7. Referências bibliográficas	45
CONCLUSÕES	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I

- Fig. 1. Taxa fotossintética (A) (A) e condutância estomática (g_s) (B) em plantas de *P. torta* de acordo com a interação entre as doses do glyphosate e das horas após aplicação. Os dados são médias de $n = 4$ 19
- Fig. 2. Taxa transpiratória (E) (A, B), relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_A) (C, D), em plantas de *P. torta* de acordo com as doses do glyphosate ($n=32$) e das horas após aplicação ($n=40$). 20
- Fig. 3. Rendimento quântico máximo do FS II (F_v/F_m) (A), rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) (B), em plantas de *P. torta* de acordo com a interação entre as doses do glyphosate e das horas após aplicação. Os dados são médias de $n = 4$ 21
- Fig. 4. Taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) (C), coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (D) em plantas de *P. torta* de acordo com a interação entre as doses do glyphosate e das horas após aplicação. Os dados são médias de $n = 4$212
- Fig. 5. Clorofila *a* (A, B), clorofila *b* (C, D) e clorofila total (E, F), sobre as doses do herbicida glyphosate ($n=40$) e horas após aplicação ($n=32$), em plantas de *P. torta* .. 233

CAPÍTULO II

- Fig. 1. Sintomas visuais das folhas jovens de *P. torta* tratadas com doses crescentes de glyphosate. Legenda: Ne (Necroses)..... 399
- Fig. 2. Açúcares solúveis totais (A), açúcares redutores (B), açúcares não redutores (C), e amido (D), em plantas de *P. torta*. tratadas com doses crescentes de glyphosate ($n=32$). 40
- Fig. 3. Taxa respiratória em plantas de *P. torta* tratadas com doses crescentes de glyphosate ($n=32$) (A) e das horas após aplicação ($n=20$) (B). As barras na vertical representam o erro padrão da média. 41
- Fig. 4. Ácido chiquímico em plantas de *P. torta* tratadas com doses crescentes de glyphosate ($n=32$) (A) e das horas após aplicação ($n=20$) (B)..... 41
- Fig. 5. Visão geral dos efeitos no metabolismo de plantas de *P. torta* decorrentes de alterações bioquímicas diante da ação do glyphosate. Seta entre parênteses (\uparrow) simboliza o aumento do produto. Igual entre parênteses (=) simboliza normalidade da respiração. 44

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS ABREVIACÕES E UNIDADES

<i>A</i>	Taxa fotossintética	($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
AC	Ácido chiquímico	
AMPA	Ácido aminometilfosfônico	
ATP	Adenosina trifosfato	
<i>Ci/Ca</i>	Relação entre concentração interna e externa de CO_2	
CO_2	Dióxido de carbono	
<i>E</i>	Taxa Transpiratória	($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
EPSP	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato	
EPSPs	Sintase do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato	
ETR	Taxa relativa de transporte de elétrons	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
EROs	Espécies reativas de oxigênio	
<i>Fv/Fm</i>	Rendimento quântico máximo do fotossistema II	
<i>gs</i>	Condutância estomática	($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido	
GOX	Enzima glyphosate desidrogenase	
NPQ	Coefficiente de extinção não fotoquímica	
PEP	Fosfoenolpiruvato	
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
S3P	Chiquimato-3-fosfato	
SAEG	Sistema de Análises Estatísticas Gerais	
$\Delta F/Fm'$	Rendimento quântico efetivo	

RESUMO

BATISTA, Priscila, F. MSc^a., Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, Fevereiro de 2014. **Biomarcadores da ação do glyphosate em plantas *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.: uma espécie nativa do domínio Cerrado** Orientador: DSc. Alan Carlos Costa. Coorientadores: DSc^a. Clarice Aparecida Megguer e DSc. Adriano Jakelaitis.

O uso do glyphosate tem aumentado ao longo das últimas décadas, constituindo importante ferramenta para a expansão da produção agrícola nacional. No entanto, essa prática pode estar associada a problemas de ordem ambiental, sobretudo pelo efeito deste herbicida em organismos não alvos. Diante disso, objetivou-se, com este estudo, verificar alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em plantas de *Pouteria torta* Mart. Radlk que possam ser utilizadas como biomarcadores da ação do glyphosate. Foram obtidas plantas de *P. torta*, a partir de sementes, cultivadas em vasos, e após 16 meses de plantio, foram aplicados os tratamentos consistindo das seguintes doses de glyphosate: 0 (controle), 25, 50, 100, 200, 400, 800 e 1200 g e.a. ha⁻¹. Foram avaliadas as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a*, o teor de pigmentos cloroplastídicos, análise visual, determinação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, açúcares não redutores, amido, taxa respiratória e o teor de ácido chiquímico. O glyphosate promoveu redução das trocas gasosas, da fluorescência da clorofila *a* e no teor de pigmentos cloroplastídicos, com exceção da razão *Ci/Ca* e do NPQ que aumentou, em plantas de *P. torta*, no entanto, a condutância estomática foi a característica mais afetada e a que exerceu maior efeito os demais parâmetros fotossintéticos. Além disso, o glyphosate promoveu alterações visuais como clorose e

necrose nas folhas jovens, assim como o acúmulo do ácido chiquímico nestas folhas. Nas folhas expandidas foi observado o acúmulo de carboidratos. O acúmulo do ácido chiquímico confirma o efeito do glyphosate na inibição da atividade da EPSPs. Os sintomas visuais, as alterações na condutância estomática e o acúmulo de ácido chiquímico, demonstraram ser bons biomarcadores da ação do glyphosate em folhas de plantas de *P. torta*.

PALAVRAS-CHAVE: carboidratos, condutância estomática, EPSPs, herbicida, metabolismo.

ABSTRACT

BATISTA, Priscila, F. MSc^a., Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, February 2014. **Biomarkers of glyphosate action in *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. plants: a native specie of Brazilian Savanna.** Advisor: DSc. Alan Carlos Costa. Co-Advisors: DSc^a. Clarice Aparecida Megguer and DSc. Adriano Jakelaitis.

Glyphosate use has been increasing over the past decades being an important tool for expansion of national agricultural production. However, this practice may be associated with environmental impact problems, especially the herbicide effect on non-target organisms. Therefore, this study was carried out to verify biochemical, physiological and morphological changes in *Pouteria torta* Mart. Radlk plants that can be used as biomarkers of glyphosate action. *P. torta* plants were obtained from seeds grown in pots for 16 months, then plants were submitted to different glyphosate doses: 0 (control), 25, 50, 100, 200, 400, 800 and 1200 g e.a. ha⁻¹. Plants were evaluated to gas exchange, a chlorophyll fluorescence, the content of chloroplastid pigments, visual analysis, reducing sugar, non-reducing sugar, total soluble sugar, starch, respiratory rate and shikimic acid. Glyphosate reduced gas exchange, a chlorophyll fluorescence and the pigments content, while *Ci/Ca* ratio and NPQ increased in *P. torta* plants. However, stomatal conductance was the characteristic that was most affected and had a higher effect under other characteristics. Furthermore, glyphosate promoted visual changes such as chlorosis and necrosis in young leaves, as well as the accumulation of shikimic acid in these leaves. In the mature leaves the accumulation of carbohydrates was observed. The accumulation of shikimic acid confirms the effect of glyphosate in the inhibition of EPSPs activity. The visual symptoms, stomatal conductance changes and

accumulation of shikimic acid, proved to be good biomarkers of glyphosate action in *P. torta* leaves.

KEY WORDS: carbohydrates, stomatal conductance, EPSPs, herbicides, metabolism.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior domínio do Brasil (SILVA, 2010), e uma das regiões mais ricas em termos de espécies vegetais vasculares por hectare. Com grande concentração de espécies endêmicas, é considerado um dos centros de biodiversidade mais importantes do planeta e um dos *hotspots* mundiais (MYERS et al., 2000). De acordo com Fernandes e Pessoa (2011), a topografia plana, além das condições sazonais, possibilitou o Cerrado ser uma área de grande potencial agrícola. Atualmente, quase 25% de toda a produção de grãos no Brasil vem dessa região (MITTERMEIER et al., 2005).

A expansão agrícola vem acompanhada da necessidade de adoção de tecnologias que a torne viável. Normalmente essas tecnologias estão associadas à utilização de insumos químicos, como herbicidas (SPADOTTO, 2002), fertilizantes, entre outros. A utilização dos herbicidas constitui importante ferramenta para alcançar produções elevadas (PROCÓPIO et al. 2008), porém, a intensificação do uso desses produtos promovem diversos problemas de ordem ambiental (KLAUCK, 2011).

A perda da biodiversidade nas parcelas agrícolas e no seu entorno se caracteriza como um dos principais e preocupantes problemas ambientais causados pelo uso intensivo e descontrolado de herbicidas. A biodiversidade é afetada pelas alterações da dinâmica natural, resultantes da pressão de seleção exercida sobre os organismos, tendo como consequência, mudanças no funcionamento do ecossistema afetado (SPADOTTO, 2006; LIMA et al., 2007). Os herbicidas alteram o metabolismo das plantas, ocasionando ações deletérias (LIMA, 2000) que, geralmente, são precedidos por mudanças na capacidade fotossintética, compreendidos por danos aos fotossistemas e redução da taxa de assimilação de CO₂ (DEMMIG-ADAMS et al., 1996), além de

alterações bioquímicas, por causa da inibição de sistemas enzimáticos ou proteínas específicas das plantas (MESCHEDE et al., 2008).

O principal herbicida utilizado no sistema de plantio direto é o glyphosate, (FERREIRA et al., 2006), sendo comercializado em mais de 130 países e aprovado para o controle de diversas plantas daninhas (VELINI et al., 2009). Seu uso foi intensificado em aplicações pós-emergência em plantas de soja geneticamente modificadas, conhecidas como soja RoundupReady® (PETTER et al., 2007). O glyphosate (N-fosfometil-glicina) tem dominado o mercado de herbicidas desde sua introdução comercial, em 1974 (FRANCO et al., 2012), sendo um herbicida sistêmico e não seletivo (YAMADA e CASTRO, 2007; ZHAO et al., 2011). O glyphosate é móvel no floema e é rapidamente translocado, via simplasto, para todas as partes da planta acumulando preferencialmente, nas regiões meristemáticas (YAMADA e CASTRO, 2007).

O glyphosate atua inibindo a ação da enzima sintase do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSPs), levando ao acúmulo do ácido chiquímico nos tecidos vegetais (VELINI et al., 2009), impedindo a transformação de ácido chiquímico em corismato, resultando em acúmulo do ácido chiquímico e comprometimento da biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (COUTINHO e MAZO, 2005). Além disso, reduz o teor de clorofila, a síntese de proteínas, da lignina, do ácido indolacético, estimula a produção de etileno, altera a permeabilidade de membranas e interfere no processo transpiratório (COLE, 1985; YAMADA e CASTRO, 2007). Provoca, ainda, danos celulares irreversíveis, tais como a ruptura parcial do cloroplasto (MENEZES et al., 2004). E por fim, provoca alterações nas características das trocas gasosas (OLESEN e CEDERGREEN, 2010; ZOBIOLE et al. 2011), promovendo o declínio da fotossíntese, decorrente da limitação estomática (YAN et al., 2010), mesmo não sendo o alvo primário desse herbicida (YANNICCARI et al., 2012).

Segundo Spadotto (2006), a deriva, ou o desvio na rota de gotículas formadas durante a pulverização que não atingem o alvo, constituindo uma das causas de perdas de herbicidas, gerando, conseqüentemente, a contaminação ambiental. Por meio do biomonitoramento pode-se avaliar a extensão e a direção das respostas da comunidade biológica em função dos impactos ocorridos no meio ambiente pelos herbicidas (SILVEIRA, 2004). O biomonitoramento pode ser uma alternativa eficaz para detectar os efeitos de poluentes sobre organismos, fornecendo avisos precoces de mudanças no ambiente, que constituem riscos para espécies, populações, comunidades ou

ecossistemas. Esta técnica pode ainda ser utilizada como medida reguladora, e como prova contra ações criminosas causadoras de danos ambientais (KLUMPP et al., 2001; FURLAN, 2007; ANDRÉA, 2008).

A identificação de espécies nativas bioindicadoras facilita o monitoramento da unidade de conservação com relação ao fluxo de herbicidas (FRANÇA, 2006). Bioindicadores podem ser definidos como organismos (uma parte de um organismo ou de uma população de organismos) que são capazes de fornecer informações sobre a qualidade do seu ambiente e que apresentam os sintomas visíveis como necrose, clorose, redução de crescimento, entre outros (DE TEMMERMAN et al., 2004). As plantas bioindicadoras além da sensibilidade devem possuir alta taxa de crescimento, ampla distribuição geográfica, e homogeneidade genética (NUNES e VIDAL, 2009). Já as respostas aos distúrbios decorrentes do uso de poluentes são caracterizadas pelos biomarcadores, que oferecem informações completas e biologicamente relevantes sobre o impacto dos contaminantes tóxicos sobre os organismos (PERNÍIA et al., 2008).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Klumpp, W. Ansel, G. Klumpp, A. Fomin, Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede europeia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras, *Revista Brasil Botânica*, v. 24 (2001), pp. 511-518.
- A. M. Lima, O. S. Watrin, M. C. Y. Pessoa, A. S. Pereira, D. S. N. Campinas, R. O. Figueredo, R. F. Costa, Simulação da movimentação de agrotóxicos no solo com uso de geotecnologia, como instrumento para avaliação do potencial de risco de contaminação de águas subterrâneas na Amazônia Oriental, *Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, (2007), pp. 3397-3404.
- B. Demmig-Adams, W. W. Adams, D. H. Barker, B. A. Logan, D. R. Bowling, A. S. Verhoeven, Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation, *Physiologia Plantarum*, v. 98 (1996) pp. 253-264.
- B. Perníia, A. D. Sousa, R. Reyer, M. Castrillo, Biomarcadores de contaminação por cádmio en las plantas, *Interciência* v. 33 (2008).
- C. A. Spadotto, Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. *Revista Núcleo de Pesquisas Interdisciplinar*, (2006). [online]. Disponível em <http://www.fmr.edu.br/npi/003.pdf>. (Acessado em 08/01/2013).

- C. A. Spadotto, Uso de Herbicidas no Brasil. Comitê de Meio Ambiente, *Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas*, (2002). [online] Disponível: <http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/> (Acessado em 08/01/2013).
- C. F. B. Coutinho, L. H. Mazo, Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão, *Química Nova*, v. 28 (2005) pp.1038-1045.
- C. F. Olesen, N. Cedergreen, Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence, *Pesticide Management Science*, v.66 (2010) pp. 536-542.
- C. M. Furlan, R. M. Moraes, P. Bulbovas, M. Domingos, A. Salatino, M. J. Sanz, *Psidium guajava* 'Paluma' (the guava plant) as a new bio-indicator of ozone in the tropics, *Environmental Pollution*, v.147 (2007).
- D. A. S. Franco, S. D. B. Almeida, A. L. Cerdeira, S. O. Duke, R. M. Moraes, A. L. S. Lacerda, M. B. Matallo, Avaliação do uso de glyphosate em soja geneticamente modificada e sua relação com o ácido chiquímico, *Planta daninha*, v.30 (2012).
- D. J. Cole, Mode of action of glyphosate – a literatura analysis. In: E. Grossbard, D. Atkinson, (Ed.), *The herbicide glyphosate*, v. 5 (1985), pp. 48-74.
- D. K. Meschede, E. D. Velini, C. A. Carbonari, Baixas doses de glyphosate e seus efeitos no crescimento de *Commelina benghalensis*, *Revista Brasileira de Herbicidas*, v.7, (2008) pp.53-58.
- E. A. Ferreira, J. B. Sil, A. A. Silva, J. A. Oliveira, L. Vargas, Translocação do glyphosate em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*), *Planta Daninha*, v. 24 (2006), pp.365-370.
- E. D. Velini, D. K. Meschede, C. A. Carbonari, M. L. B. Trindade, *Glyphosate*. Botucatu: Fundação de Estudo e Pesquisa Agrícolas e Florestais, (2009) pp. 496.
- E. J. D. França, A biomonitoração da Mata Atlântica na conservação da biodiversidade: Espécies arbóreas nativas acumuladoras de elementos químicos. *Tese Ecologia de Agroecossistemas* (2006), 380 p.
- F. A. Petter, S. O. Procópio, A. Cargnelutti Filho, A. L. L. Barroso, L. P. Pacheco, Manejo de herbicidas na cultura da soja RoundupReady, *Planta Daninha*, v. 25 (2007) pp. 557-566.
- J. B. Klauck, Impacto agroeconômico da adequação da agricultura de nova ramada, à legislação de apps e reserva legal. *Dissertação*, Pós-Graduação em Desenvolvimento, (2011), 146 p.
- J. Lima, *Bioindicação em ecossistemas terrestres*, Folha de São Paulo, (2000).

- J. S. Silva, Considerações sobre a ocupação do Cerrado na microrregião do sudoeste de Goiás: modernização versus degradação. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.3 (2010), pp. 89-99.
- K. Yan, W. Chen, X. He, G. Zhang, S. W. Xu, Responses of photosynthesis, lipid peroxidation and antioxidant system in leaves of *Quercus mongolica* to elevated O₃, *Environmental and Experimental Botany*, v.69 (2010), pp. 198-204.
- L. A. Nunes, R. A. Vidal, Seleção de plantas quantificadoras de herbicidas residuais, *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 19 (2009), pp. 19-28.
- L. De Temmerman, J. N. B. Bell, J. P. Garrec, A. Klumpp, G. H. M. Krause, A. E. G. Tonneijck, Biomonitoring of air pollution with plants e considerations for the future. 2004. In: A. Klumpp, W. Ansel, G. Klumpp (Eds.), *Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness*, Cuvillier Verlag, Gottingen, (2004), pp. 337-373.
- L. H. S. Zobiole, R. J. Kremer, R. S. Oliveira Jr, J. Constantin, Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 99 (2011), pp. 53-60.
- M. M. Andréa, Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. Instituto Biológico. *Comunicado técnico*, v. 83 (2008).
- M. P. Silveira, Aplicação do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em rios. 68p. Jaguariúna: *Embrapa Meio Ambiente*, 2004.
- M. Yannicari, E. Tambussia, C. Istilartb, A. M. Castro, Efeitos do glifosato sobre as trocas gasosas e fluorescência da clorofila em dois biótipos de *Lolium perenne* L. como resposta diferencial de sensibilidade ao herbicida, *Crop Protection*, v. 32 (2012), pp. 12-16.
- N. R. A. Myers, C. G. Mittermeier, G. A. B. Fonseca, J. Kent, Biodiversity hotspots for conservation priorities, *Nature*, v. 403 (2000) pp. 853-858.
- P. A. Fernandes, V. L. O. Pessoa, O cerrado e suas atividades impactantes: Uma leitura sobre o garimpo, a mineração e a agricultura mecanizada. *Observation: Revista Eletrônica de Geografia*, v.3 (2011), pp. 19-37.
- R. A. Mittermeier, P. R. Gil, M. Hoffman, *Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions* Conservation International, (2005), 392p.

S. M. Menezes, A. A. Tillmann, L. B. Dode, F. A. Villela, Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas, *Revista Brasileira de Sementes*, v. 26 (2004), pp.150-155.

S. O. Procópio, M. L. Carmo, F. R. Pires, A. Cargnelutti-Filho, G. B. P. Braz, W. F. P. Silva, A. L. L. Barroso, G. P. Silva, E. L. Carmo, A. J. B. P. Braz, L. P. Pacheco, Efeito da densidade populacional de *Panicum maximum* (cultivar Tanzânia) na fitorremediação de solo contaminado com o herbicida picloram, *Semina: Ciências Agrárias*, v. 30 (2009), pp. 295-304.

T. Yamada, P. R. C. Castro, Efeitos do glyphosate nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas, *Informações Agrônômica*, v.119 (2007), pp. 1-24.

T. Zhao, C. Y. Lin, Z. C. Shen, Development of Transgenic Glyphosate-Resistant Rice with G6 Gene Encoding 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase, *Agricultural Sciences in China*, v.10 (2011), pp.1307-1312.

OBJETIVO

Objetivou-se com este estudo verificar alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em plantas de *Pouteria torta* Mart. Radlk que possam ser utilizadas como biomarcadores da ação do glyphosate.

CAPÍTULO I

CARACTERÍSTICAS FOTOSSINTÉTICAS COMO BIOMARCADORES DA AÇÃO DO GLYPHOSATE EM PLANTAS DE *Pouteria torta* (Mart.) Radlk

(Normas de acordo com a revista Pesticide Biochemistry and Physiology)

RESUMO

Os biomarcadores podem ser utilizados para o biomonitoramento da ação de herbicidas sobre espécies não alvo. No entanto, estudos que determinem características fotossintéticas como biomarcadores, quando se trata do glyphosate são necessários. Objetivou-se com a presente pesquisa determinar quais características fisiológicas são mais adequadas para utilização como biomarcadores em plantas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk., submetidas à ação do glyphosate. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos aos acaso, em esquema fatorial 8 (doses) x 10 (tempos de avaliação), com 4 repetições, totalizando 320 unidades experimentais. As doses de glyphosate utilizadas foram: 0 (controle), 25, 50, 100, 200, 400, 800 e 1200 g e.a. ha⁻¹. As avaliações foram realizadas, nos tempos de 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 240 horas após a aplicação do herbicida, sempre em uma folha completamente expandida. Foram avaliadas as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a* e o teor de pigmentos cloroplastídicos. O glyphosate diminuiu as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a*, e ainda, o teor de pigmentos cloroplastídicos, poucas horas após a aplicação, com exceção da razão *Ci/Ca* e do NPQ que aumentou. No entanto, a condutância estomática demonstrou ser a característica com sensibilidade sobre o comportamento das demais análises, concluindo ser um bom biomarcador fisiológico da ação do glyphosate em plantas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.

Palavras-chave: condutância estomática; fotossíntese; herbicida, Cerrado.

1. Introdução

As plantas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. (Família Sapotaceae) são encontradas em todo domínio Cerrado brasileiro e utilizadas para fins alimentícios e medicinais por possuírem atividade antifúngica e inseticida (LORENZI, 2002; BOLETI et al., 2007). São também utilizadas como ornamentais e em projetos de recomposição de áreas degradadas (PERFEITO et al., 2005).

No Brasil, o domínio Cerrado sofreu profundas alterações ao longo das últimas décadas decorrentes da expansão da agricultura, com forte intensificação do uso de herbicidas. Entre os herbicidas, o glyphosate se destaca pela intensidade e frequência do seu uso e, principalmente, pelo seu mecanismo de ação (PIOLA et al., 2013). O glyphosate é sistêmico e se transloca na planta, via floema, até os meristemas (MACHADO et al., 2010). O herbicida possui amplo espectro e atua inibindo a ação da sintase do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSPs), considerada enzima-chave na via do ácido chiquímico, em que ocorre a biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina (ZABLOTOWICZ e REDDY, 2004; DAYAN e ZACCARO, 2012). Além disso, alguns estudos relatam que o glyphosate induz alterações nos parâmetros fisiológicos, dentre eles, na taxa fotossintética, transpiratória e na abertura dos estômatos, que podem ter efeito direto ou indireto sobre a fotossíntese (OLESEN e CEDERGREEN, 2010; YANNICCARIA et al., 2012).

Na fotossíntese, parte da energia da luz absorvida é efetivamente utilizada (energia fotoquímica) e o excedente é liberada como energia não fotoquímica, na forma de calor (NPQ) e de fluorescência da clorofila *a* (DAYAN e ZACCARO, 2012). Alterações nas características da fotossíntese, dentre elas a taxa fotossintética e a condutância estomática, e ainda nas características da fluorescência, são bons

indicadores da ação de xenobióticos (OLESEN e CEDERGREEN, 2010; DAYAN e ZACCARO, 2012; YANNICCARIA et al., 2012).

Mesmo o glyphosate sendo um herbicida de uso tão amplo, há necessidade de estudos sobre o que ocorre com o metabolismo, após a inibição da EPSPs, que leva a planta à morte (OLESEN e CEDERGREEN, 2010; YANNICCARIA et al., 2012). No entanto, embora escassos em plantas, maior número de estudos são encontrados com animais, e levaram à descoberta de bons biomarcadores da ação do glyphosate em diversas espécies (GUNGORDU, 2013; NWANI et al., 2013; IUMMATO et al., 2013).

Os biomarcadores são conhecidos como alterações morfológicas, anatômicas, fisiológicas ou moleculares que, ocorrendo em organismos, podem ser associados à presença de contaminantes ou poluentes no ambiente (PERNIA et al., 2008). Normalmente, os biomarcadores indicaram de forma rápida e precisa, níveis de contaminação no ambiente que potencialmente colocam em risco o próprio organismo, a comunidade e até mesmo o ecossistema (AMORIM, 2003). De modo geral, os principais biomarcadores em plantas, estão associados a respostas que ocorrem na atividade fotossintética, na síntese de metabólitos secundários, no estresse oxidativo e / ou nos mecanismos de desintoxicação (FERRAT et al., 2003).

Dessa forma, faz-se necessária a realização de estudos sobre biomarcadores rápidos e sensíveis diante a ação do glyphosate em espécies vegetais nativas do domínio Cerrado, no intuito de avaliar os riscos, tentando quantificar a ação desse herbicida sobre organismos não alvos (CEDERGREENA et al., 2007). Diante do exposto, objetivou-se determinar quais características fisiológicas são mais adequadas para utilização como biomarcadores da ação do glyphosate em plantas de *Pouteria torta* Mart. Radlk.

2. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde - GO, Brasil, em condições controladas, em casa de vegetação climatizada do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, durante o mês de abril de 2013.

2.1. Material vegetal e condições experimentais

Os frutos de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. foram coletados no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde - GO, Brasil, despulpados em peneira, e as sementes lavadas e secas em local ventilado e sombreado, sendo posteriormente semeadas em areia. Após 60 dias, as plantas jovens foram transferidas para vasos de polietileno contendo 10 kg de substrato preparado a partir da mistura de duas partes de solo do tipo Latossolo Vermelho distroférico típico e uma parte de areia. De acordo com a análise química do solo, o substrato utilizado possui as seguintes características: pH em H₂O de 6,3; 0,7 mg/dm⁻³ de P; 8 mg/dm⁻³ de K; 240,0 mg/dm⁻³ de Ca; 24,30 mg/dm⁻³ de Mg; 174,0 mg/dm⁻³ de H+Al; 11,0 g kg⁻¹ de matéria orgânica e 68% de saturação por bases. O substrato, em cada vaso, foi adubado com 1525,0 mg de Nitrogênio; 1175,0 mg de K₂O; 6900,0 mg de P₂O₅ e 400,0 mg de micronutrientes (Fritted Traced Elements[®], São Paulo, Brasil).

Plantas com 16 meses de idade foram padronizadas quanto ao tamanho e vigor e transferidas para casa de vegetação, 30 dias antes da imposição dos tratamentos, para aclimatização.

As variáveis microclimáticas (radiação fotossinteticamente ativa, temperatura e umidade relativa) da casa de vegetação, durante o período de avaliação, foram monitoradas por meio da estação meteorológica (WATCH DOG - Weather Station, Spectrum Technologies[®], Inc, Aurora, Estados Unidos).

Os tratamentos constituíram da aplicação do herbicida glyphosate (Roundup Transorb[®], sal de isopropilamina com 480 g L⁻¹ do equivalente ácido) nas seguintes doses: 0 (controle), 25, 50, 100, 200, 400, 800 e 1200 g e.a. ha⁻¹. As aplicações do herbicida foram realizadas utilizando pulverizador costal (Herbicat[®] Catanduva, Brasil) com pressão constante, mantida por CO₂ comprimido, munido de barra com quatro pontas de pulverização e bico da série XR Teejet[®], tipo leque modelo XR11002-VP. A pressão de serviço utilizada foi de 5 kgf cm⁻², proporcionando um volume de calda de 180 L ha⁻¹.

As avaliações foram realizadas no segundo par de folhas totalmente expandidas, entre as 08h30min e 10h30min. Em cada folha foi utilizada sempre a mesma área para obtenção dos dados de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e teor de clorofila. As avaliações ocorreram nos seguintes tempos: 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 240 horas após a aplicação do herbicida, perfazendo 10 análises.

2.2. Medições das trocas gasosas e do teor de clorofila

As trocas gasosas das plantas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. foram avaliadas para registro das taxas fotossintéticas (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiratória (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), da condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e da relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a). Estas avaliações foram realizadas utilizando um analisador automático de fotossíntese modelo LI-6400XTR (Licor[®], Nebraska, Estados Unidos) com temperatura do bloco de 24 °C e densidade de fluxo de fótons igual a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O teor de clorofila foi avaliado com medidor portátil, ClorofiLOG1030[®] (Falker[®], Porto Alegre, Brasil), sendo obtido o teor de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total, expressos no índice Clorofilog.

2.3. Medições da fluorescência de clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando um fluorômetro portátil modulado modelo MINI-PAM (Walz[®], Effeltrich, Germany), equipado com pinça especial para suporte da folha, modelo 2030-B (BILGER et al., 1995; RASCHER et al., 2000). O rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) foi calculado após 30 minutos de adaptação ao escuro (VAN e SNEL, 1990). O rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) foi determinado por meio da sobreposição de um pulso de saturação em folhas previamente adaptadas à luz ambiente (GENTY et al., 1989). O $\Delta F/F_m'$ foi utilizado para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR, $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (BILGER et al., 1995; LAISK e LORETO, 1996) e o coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) foi calculado segundo Bilger e Bjorkman (1990).

2.4. A análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos aos acaso, em esquema fatorial 8 (doses) x 10 (tempos de avaliação), com 4 repetições, totalizando 320 unidades experimentais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ajustados aos modelos de regressão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Sistema de Análises Estatísticas Gerais (SAEG 9.0 – UFV, Viçosa) e, para a confecção dos gráficos, foi utilizado o software SigmaPlot V.10 (SPSS Inc., USA).

3. Resultados

3.1 Variáveis microclimáticas

Durante o período experimental a média de radiação fotossinteticamente ativa foi de $274 \pm 8,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e máxima de $597 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A temperatura variou de 23 a 26 °C, enquanto a umidade relativa variou entre 61 e 80%, com a média de 66%. As baixas variações nesses parâmetros indicam que, nas plantas avaliadas, não ocorreu sobreposição de estresse e, sendo assim, os resultados obtidos foram decorrentes da ação do herbicida glyphosate.

3.2. Trocas gasosas

Tanto a taxa fotossintética (A) quanto a condutância estomática (g_s) diminuíram em função das doses de glyphosate e do tempo após aplicação do herbicida. A taxa fotossintética diminuiu acentuadamente em função do aumento das doses do glyphosate, sobretudo às 240 horas após aplicação, em que a diminuição foi superior a 70% nas plantas submetidas a dose de 1200 g e.a. ha⁻¹ em relação ao controle (Fig. 1A). Comportamento semelhante foi observado na g_s , em que o aumento das doses do glyphosate promoveu redução de até 75% nesta característica, com efeito mais pronunciado a partir das 72 horas após aplicação (Fig. 1B).

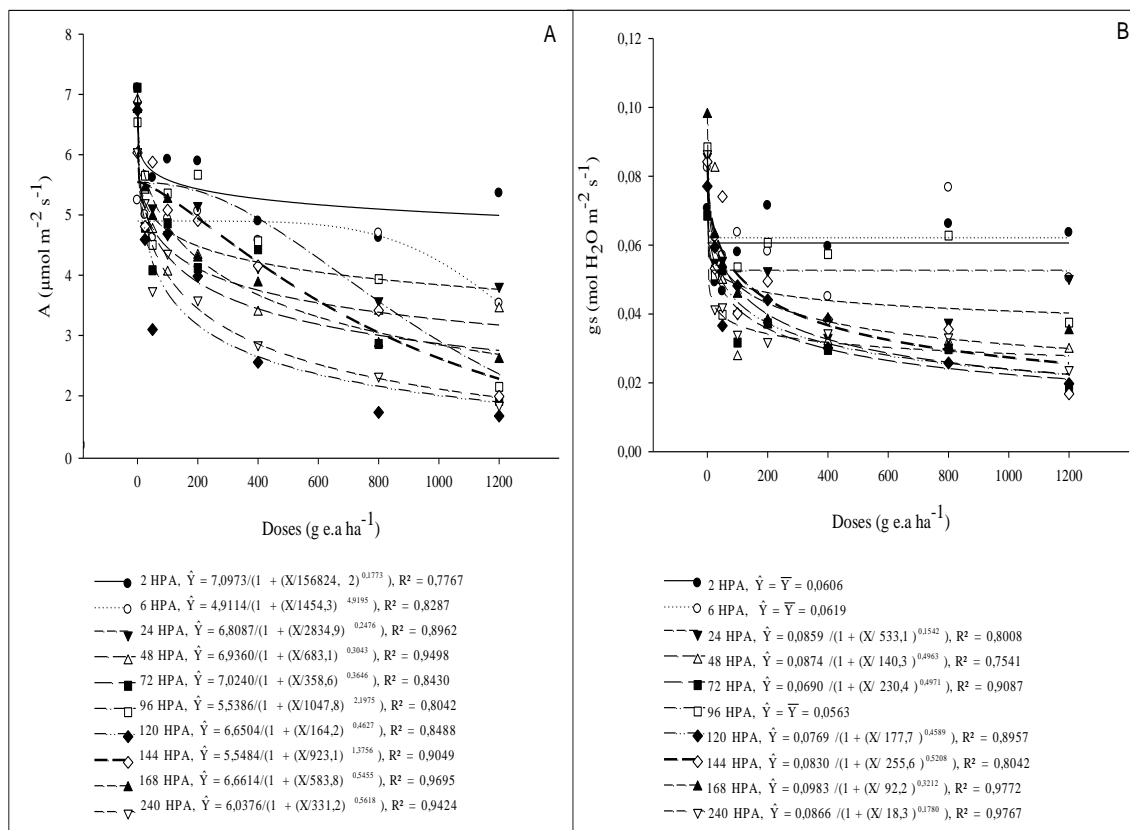


Fig. 1. Taxa fotossintética (A) (A) e condutância estomática (g_s) (B) em plantas de *P. torta* de acordo com a interação entre as doses do glyphosate e das horas após aplicação. Os dados são médias de $n = 4$.

A taxa transpiratória (E) diminuiu e a relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) aumentou em função de efeitos independentes do herbicida e do tempo após a aplicação.

Em decorrência do efeito sobre a g_s , ocorreu decréscimo acentuado na taxa transpiratória (Fig. 2 A e 2 B), com redução de 57% na dose $1200 \text{ g e.a. ha}^{-1}$ em relação ao controle. Verificou-se, ainda, aumento da C_i/C_a entre as doses avaliadas (Fig. 2 C, D), que foi superior a 53% as 240 horas após aplicação.

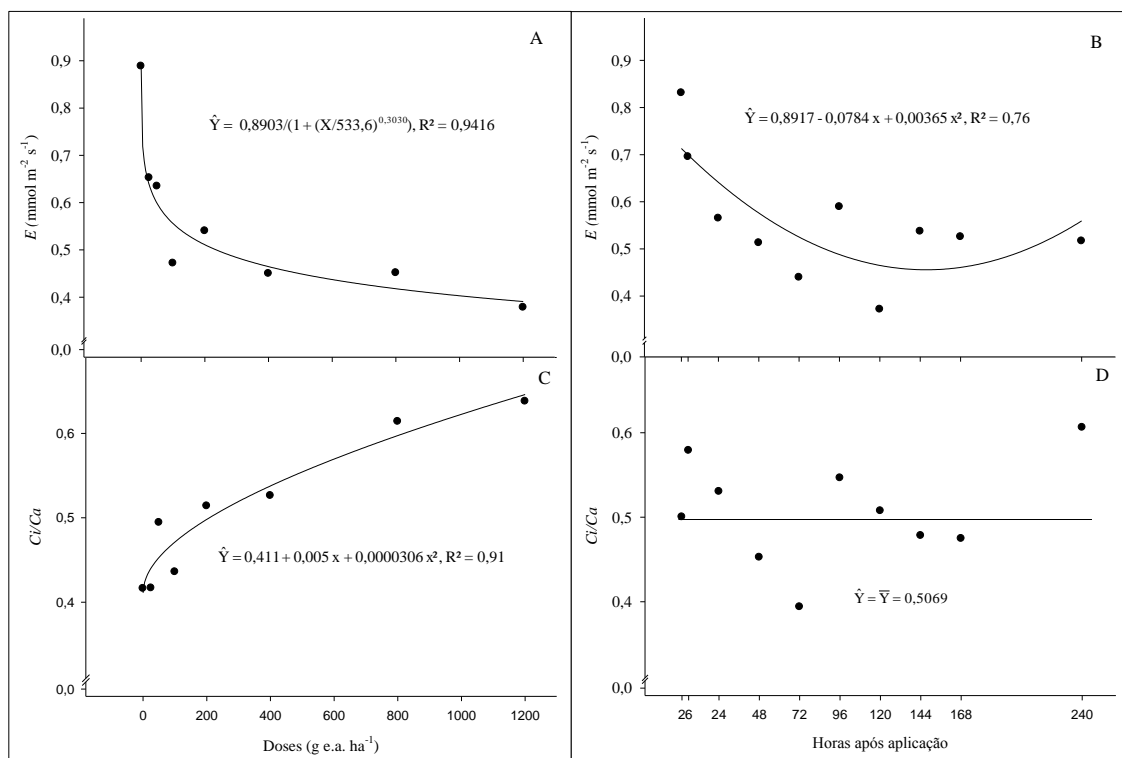


Fig. 2. Taxa transpiratória (E) (A, B) e relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) (C, D), em plantas de *P. torta* de acordo com as doses do glyphosate ($n = 32$) e das horas após aplicação ($n = 40$).

3.3. Fluorescência da clorofila *a*

As doses do glyphosate e o tempo após a aplicação promoveram alterações pronunciadas no rendimento quântico máximo do FS II (F_v/F_m), no rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$), na taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) e no coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (Fig. 3 e 4).

A F_v/F_m das plantas controle neste estudo se mantiveram em torno de 0,63 e nas plantas tratadas esses valores reduziram a 0,43, principalmente a partir de 96 horas após a aplicação do herbicida (Fig. 3 A).

Houve redução de 50% tanto nos valores da $\Delta F/F_m'$ quanto da ETR em função do aumento das doses e do tempo após a aplicação do glyphosate (Fig. 3 B e Fig. 4 A). O herbicida também promoveu aumento acentuado nos valores do NPQ sendo de 96% na última avaliação, em comparação ao controle com a maior dose do glyphosate (Fig. 4 B).

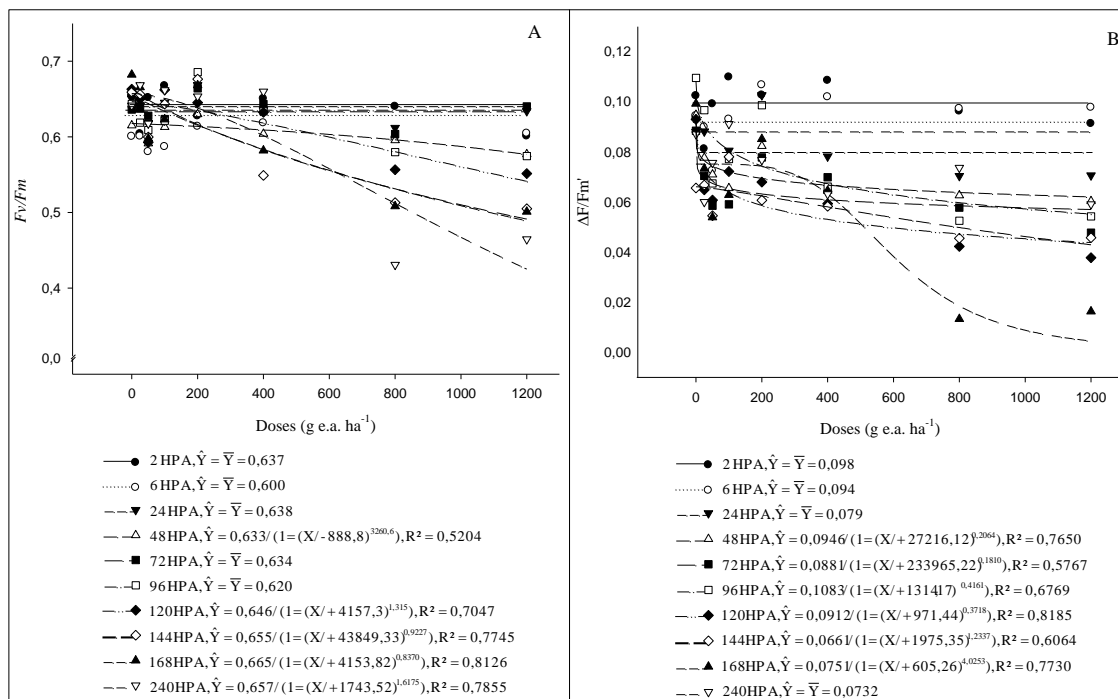


Fig. 3. Rendimento quântico máximo do FS II (F_v/F_m) (A), rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) (B), em plantas de *P. torta* de acordo com a interação entre as doses do glyphosate e das horas após aplicação. Os dados são médias de $n = 4$.

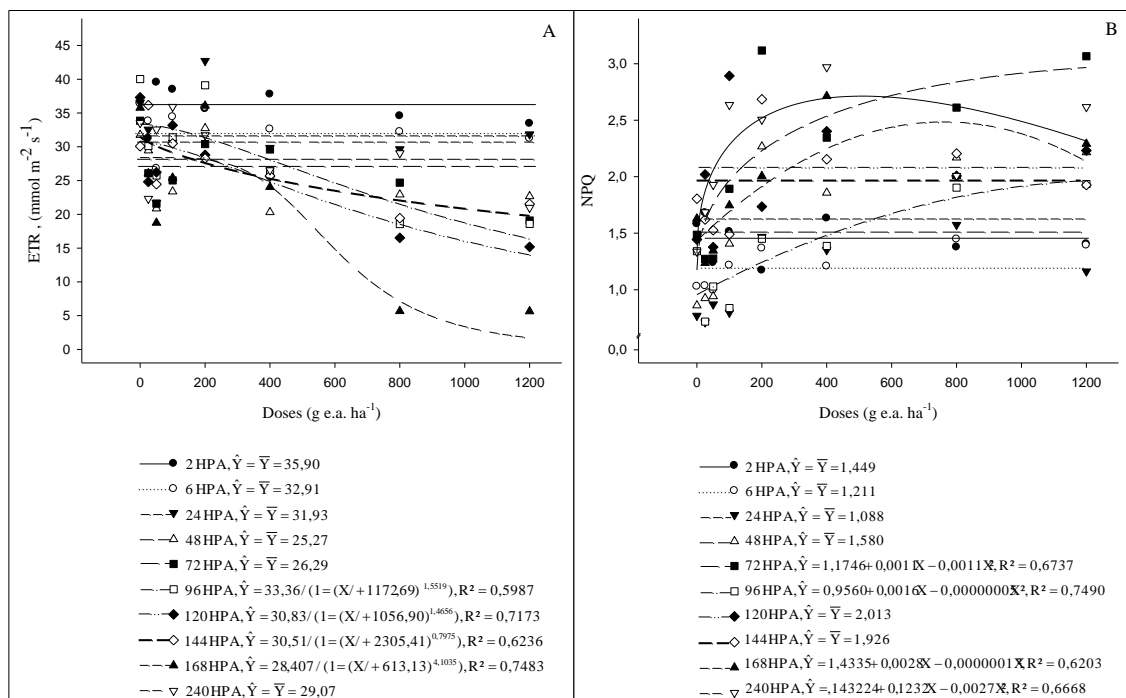


Fig. 4. Taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) (A), coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (C) em plantas de *P. torta* de acordo com a interação entre as doses do glyphosate e das horas após aplicação. Os dados são médias de $n = 4$.

3.4. Teor de clorofila

O teor de clorofila *a*, *b* e total diminuíram, tanto por efeito das doses do herbicida quanto pelo tempo após a aplicação. Esse decréscimo foi de 23% para a clorofila *a*, de 41% para a clorofila *b* e de 27% para a clorofila total, nas plantas submetidas a dose 1200 g e.a. ha⁻¹ (Fig. 5 [A, C, E]). Redução significativa dos pigmentos ocorreu, também, com o decorrer do tempo após a aplicação do herbicida (Fig. 5 [B, D, F]).

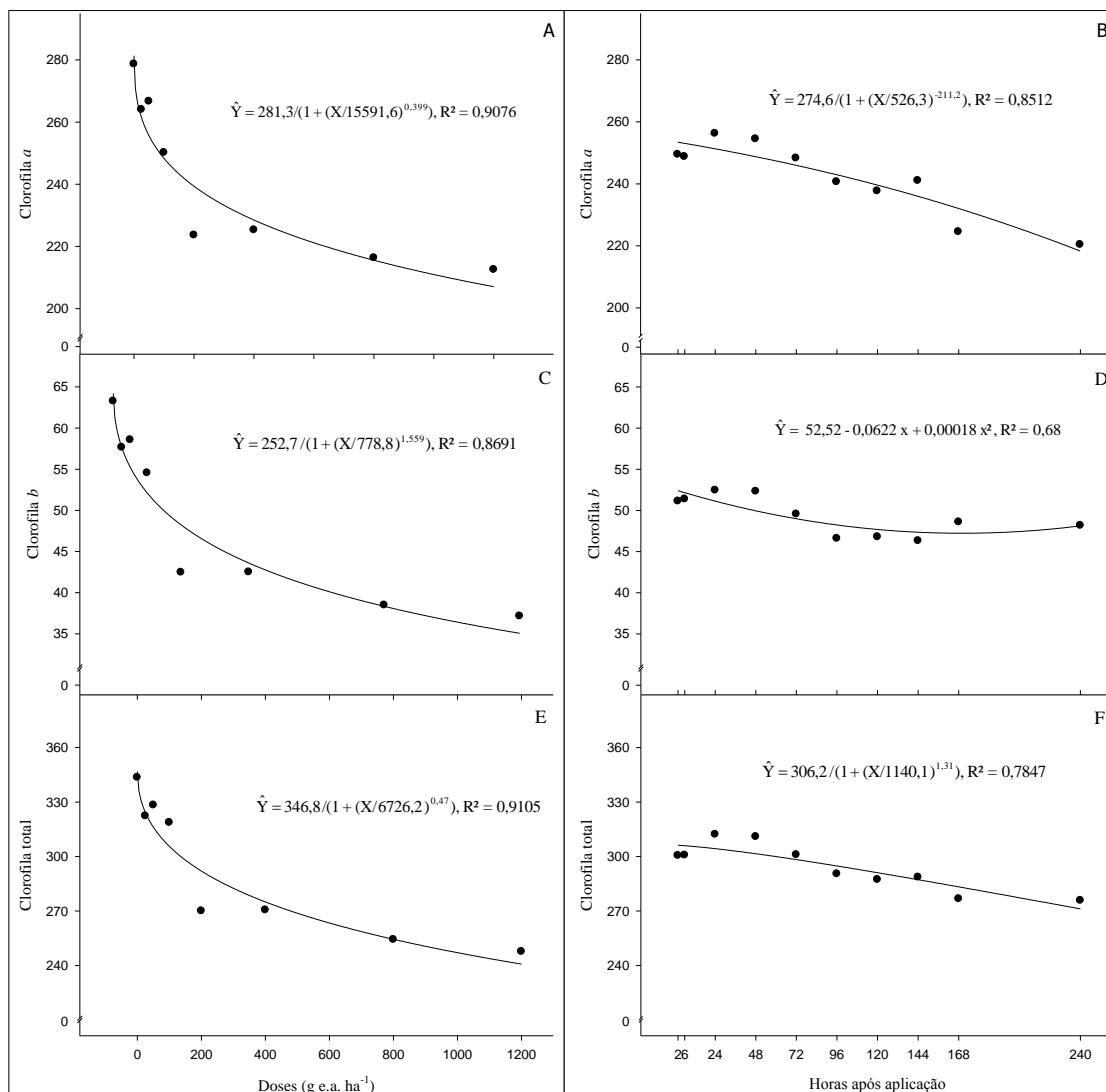


Fig. 5. Clorofila *a* (A, B), clorofila *b* (C, D) e clorofila total (E, F), em função das doses do herbicida glyphosate ($n = 40$) e horas após aplicação ($n = 32$), em plantas de *P. torta*.

4. Discussão

O glyphosate promoveu danos à maquinaria fotossintética de plantas de *Pouteria torta*, sendo evidenciados poucas horas após a aplicação do herbicida, com alterações nas trocas gasosas e, conseqüentemente, no metabolismo de carbono. A taxa fotossintética (A) é um dos processos mais afetados por herbicidas (HORBOWICZ et al., 2013), incluindo o glyphosate (ORCARAY et al., 2010).

Embora o processo fotossintético não seja o alvo principal do glyphosate, estudos apontam o declínio da fixação de carbono em plantas tratadas (MATEOS-

NARANJO et al., 2009; ORCARAY et al., 2010). Esses efeitos estão associados a desregulação do controle estomático e, em consequência, alterações na abertura e fechamento dos estômatos, (YAMADA e CASTRO, 2007), provocando efeitos nas taxas fotossintéticas e transpiratórias (E). Ocorreu redução na condutância estomática (g_s) nas primeiras horas após aplicação do glyphosate, mesmo nas doses baixas. Isso sucedeu, provavelmente, por causa dos danos nas células estomáticas causados por esse herbicida (YANNICCARIA et al., 2012), conforme observado em *Eucaliptus grandis*, em que houve diminuição da E nas plantas expostas ao glyphosate (PEREIRA et al., 2010).

O aumento da relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) observado nas plantas expostas ao glyphosate resultou do incremento de CO_2 na câmara subestomática, em decorrência da baixa taxa de fixação de carbono no ciclo de Calvin, que é dependente da disponibilidade de ATP e NADPH as alterações observadas nos parâmetros da fluorescência da clorofila a , no rendimento quântico efetivo do FSII ($\Delta F/F_m'$) e na taxa de transporte de elétrons (ETR) indicam que a produção de ATP e NADPH foram afetadas pelo glyphosate. Em trabalhos com outros poluentes, resultados semelhantes já foram observados, em que a produção de ATP e NADPH foram diminuídas com consequente aumento da C_i/C_a (WATANABE et al., 2013). Além disso, o glyphosate pode ainda diminuir a atividade da Rubisco, levando consequentemente a diminuição da atividade do Ciclo de Calvin, como observado em plantas de *B. maritimus* (MATEOS-NARANJO e PEREZ-MARTIN, 2013). Essa alteração na atividade da Rubisco pode ser decorrente da formação espécies reativas de oxigênio (EROs), que regulam negativamente essa enzima (AHSAN et al., 2008).

Independente da dose aplicada, o glyphosate promoveu reduções nos valores da razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima (F_v/F_m), no $\Delta F/F_m'$, na ETR e aumento na dissipação de energia na forma de calor (NPQ). Estes resultados reforçam o comportamento observado na A , confirmando a ação deste herbicida na limitação da assimilação de carbono em plantas (YANNICCARIA et al., 2012; QIUA, et al, 2013; QIUB, et al, 2013). Tanto a diminuição da ETR e do $\Delta F/F_m'$, quanto o aumento do NPQ, estão relacionados a baixa atividade do Ciclo de Calvin em plantas tratadas com glyphosate, conforme observado por Yanniccaria et al. (2012). Resultados semelhantes foram observados em plantas de *Spartina densiflora* (MATEOS-NARANJO et al., 2009). O aumento do NPQ é o indicativo que parte do excesso da radiação fotossinteticamente ativa foi dissipada na forma de calor, por meio do Ciclo

das Xantofilas (GUIRAO et al., 2013). Outras formas de dissipação do excesso de energia na forma de calor nos complexos antena do FSII estão associadas às mudanças no gradiente de pH, desconexão dos complexos móveis captadores de luz e na protonação de PsbS que são subunidades integrais da membrana de FSII (BAKER, 2008). Este mecanismo minimizam os danos nos fotossistemas contra a fotoxidação (KIELAK et al., 2011).

Neste estudo, a redução observada na Fv/Fm ocorreu partir das 48 HAA do glyphosate, podendo ser por causa dos danos ocorridos no fotossistema II das plantas de *P. torta*, diminuindo a sua eficiência quântica máxima (QUIA et al., 2013). Esse efeito do glyphosate sobre a fotossíntese indica que essa espécie apresenta alta sensibilidade ao herbicida.

Estudos confirmam que um dos fatores responsáveis pela redução na taxa fotossintética está relacionada com o declínio no teor de clorofilas (YANNICCARIA et al., 2012; ZOBIOLE et al., 2011), como também foi observado nas plantas de *P. torta* deste estudo. A redução do teor de clorofila em plantas tratadas com glyphosate pode ocorrer tanto em função da inibição da sua biossíntese, quanto pela sua degradação (MOLDES et al., 2013). A biossíntese de clorofilas pode ser afetada pelo glyphosate pela ação quelante que o herbicida exerce ao interagir com nutrientes como o nitrogênio, o magnésio e o manganês, formando o complexo metal-glyphosate (SORATTO et al., 2004; ZOBIOLE et al., 2011) que é pouco solúvel em tecidos vegetais (EKER et al., 2006; ZOBIOLE et al., 2011; MATEOS-NARANJO e PEREZ-MARTIN, 2013). Segundo Kielak et al., (2011) o glyphosate também pode inibir a biossíntese de clorofilas, reduzindo a formação do ácido δ -aminolevulínico, que é o precursor de porfirinas, sendo uma estrutura química integrante de algumas enzimas antioxidantes, como a catalase, ascorbato peroxidase e citocromos.

O presente estudo fornece evidências dos efeitos do glyphosate sobre as características fotossintéticas das plantas de *P. torta*. De modo geral, o glyphosate afetou o processo fotossintético das plantas por meio da alteração de diversos parâmetros, como a condutância estomática, que por sua vez afetou diretamente as taxas fotossintéticas e transpiratórias, passando pelo sistema de absorção da energia radiante, por meio dos pigmentos cloroplastídicos, indo até a transferência de energia para a formação de ATP e NADPH, avaliados por meio da fluorescência da clorofila *a*. Diversas características nestas etapas podem ser utilizadas como biomarcadores da ação do glyphosate em plantas de *P. torta*. Entretanto, considerando a rapidez e a

estabilidade da resposta, a condutância estomática demonstrou ser a característica com maior sensibilidade ao herbicida e a que mais rapidamente influenciou o comportamento das demais características avaliadas.

5. Conclusões

Com exceção da razão C_i/C_a e do NPQ, todas as demais características das trocas gasosas, da fluorescência da clorofila *a*, e ainda, o teor de pigmentos cloroplastídicos, foram negativamente afetados pelo glyphosate.

O aumento da razão C_i/C_a , concomitante à diminuição da condutância estomática, é uma evidência da ação do glyphosate sobre a atividade do Ciclo de Calvin.

Considerando o papel determinante da condutância estomática nas trocas gasosas das plantas, aliado a sensibilidade e rapidez de resposta ao glyphosate, esta característica demonstrou ser um bom biomarcador da ação do glyphosate em plantas de *P. torta*.

6. Referências bibliográficas

- A. Gungordu, Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*, *Aquatic Toxicology*, v. 140-141 (2013) pp. 220-228.
- A. Laisk, F. Loreto, Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence, *Plant Physiology*, v. 110 (1996), pp. 903-91.
- A.F.L. Machado, L.R. Ferreira, L.D.T. Santos, F.A. Ferreira, R.G. Viana, M.S. Machado, F.C.L. Freitas, Eficiência fotossintética e uso da água em plantas de eucalipto pulverizadas com glyphosate, *Planta Daninha*, v. 28 (2010), pp. 319-327.
- A.P.A. Boleti, M.G.M. Freire, M.B. Coelho, W. Silva, P.A. Baldasso, V.M. Gomes, S. Marangoni, J.C. Novello, M.L.R. Macedo, Insecticidal and Antifungal Activity of a Protein from *Pouteria torta* Seeds with Lectin-like Properties, *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55 (2007), pp. 2653-2658.
- B. Genty, J.M. Briantais, N.R. Baker, The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 990 (1989), pp. 87-92.

- B. Pernia, A. D. Sousa; R. Reye, M. Castilio, Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas, *Interciência*, v. 33 (2008).
- C. A. Moldes, L. O. Medici, O. S. Abrahão, S. M. Tsai, R. A. Azevedo, Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate, *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 30 (2008), pp 469-479.
- C. F. Olesen, N. Cedergreen, Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence, *Pesticide Management Science*, v. 66 (2010), pp. 536-542.
- C.D. Nwani, N.S. Nagpure, R. Kumar, B. Kushwaha, W.S. Lakra, DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 36 (2013), pp. 539-547.
- E. Kielak, C. Sempruchb, H. Mioduszevskaa, J. Kloceka, B. Leszczyńskib, Phytotoxicity of Roundup Ultra 360 SL in aquatic ecosystems: Biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 99, (2011), pp. 237-243.
- E. Mateos-Naranjo, A. Perez-Martin, Effects of sub-lethal glyphosate concentrations on growth and photosynthetic performance of non-target species, *Bolboschoenus maritimus*. *Chemosphere*, v. 93 (2013), pp. 2631-2638.
- E. Mateos-Naranjo, S. Redondo-Gómez, L. Coxb, J. Cornejob, M.E. Figueroa, Effectiveness of glyphosate and imazamox on the control of the invasive cordgrass *Spartina densiflora*, *Toxicology and Environmental Safety*, v. 72 (2009) pp. 1694-1700.
- F.E. Dayan, M.L.M. Zaccaro, Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 102 (2012), pp. 189-197.
- H. Lorenzi, Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, *Nova Odessa Editora Plantarum*, 1 4ªed. (2002) pp.368.
- H. Qiua, J. Genga, H. Rena, X. Xiaa, X. Wang, Y. Yub, Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup® formulation, *Journal of Hazardous Materials*, v. 248-249 (2013), pp.172-176.
- J.P. Perfeito, M.L. Santos, K.S.E. López, J.E. Paula, D. Silveira, Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15 (2005), pp. 183-186.
- K.O. Van, J.F.H. Snel, The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology, *Photosynthesis Research*, v. 25 (1990) pp.147-150.

- L Ferrat, C Pergent-Martini, M Roméo Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses, *Aquatic Toxicology*, v. 65 (2003), pp. 187-204.
- L. C. A. Amorim Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais, *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6 (2003) pp.1-13.
- L. M. Guirao, J. M. Ruiz, J. M. S. Gil, J. B. Esteller, C. M. Stinco, M. A. Martínez, Xanthophyll cycle-related photoprotective mechanism in the Mediterranean seagrasses *Posidonia oceânica* and *Cymodocea nodosa* under normal and stressful hypersaline conditions, *Aquatic Botanic*, v. 109 (2013) pp. 14-24.
- L. Orcaray, M. Igal, D. Marino, A. Zabalza, M. Royuela, The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors, *Pest Management Science*, v. 66 (2010), pp. 262-269.
- L. Piola, J. Fuchs, M.L. Onet, S. Basack, E. Kesten, N. Casabé, Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions, *Chemosphere*, v. 91 (2013), pp. 545-551.
- L.H.S. Zobiole, R.J. Kremer, R.S. Oliveira Jr., J. Constantin, Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 99 (2011), pp. 53-60.
- M. Horbowicz, C. Sempruch, R. Kosson, D. Koczkodaj, D. Walas, Effect of fluazifop-p-butyl treatment on pigments and polyamines level within tissues of non-target maize plants, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 107 (2013), pp. 78-85.
- M. Watanabe, Y. Hoshika, N. Inada, X. Wang, Q. Mao, T. Koike, Photosynthetic traits of Siebold’s beech and oak saplings grown under free air ozone exposure in northern Japan, *Environmental Pollution*, v. 174 (2013), pp. 50-56.
- M. Yannicaria, E. Tambussia, C. Istilartb, A.M. Castro, Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity, *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 57 (2012), pp. 210-217.
- M. M. Iummato, E. D. Fiori, S. E. Sabatini, L. C. Cacciatore, A. C. Cochón, M. C. Molina, A. B. Juárez, Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms, *Soil Biology and Biochemistry*, v. 57 (2013), pp. 100-108.

- M. R. R. Pereira, A. C. P. Rodrigues, N. V. Costa, D. Martins, A. E. Klar, M. R. Silva, Efeito da deriva de glyphosate sobre algumas características fisiológicas em plantas de eucalipto, *Interciência*, v. 35 (2010), pp. 279-283.
- N. Ahsana, D. Leea, K. Leea, I. Alama, S. Lee, J. D. Bahka, B. Leea, Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach, *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46 (2008), pp. 1062-1070.
- N. Cedergreena, M. Abbaspoora, H. Sorensenb, J.C. Streibig, Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study with *Lemna minor*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 67 (2007), pp. 323-332.
- N. R. Baker, Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59 (2008), pp. 89-113.
- R. P. Soratto, M. A. C. Carvalho, O. Arf, Teor de clorofila e produtividade do feijoeiro em razão da adubação nitrogenada, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39 (2004), pp. 895-901.
- R.M. Zablotowicz, K.N. Reddy, Impact of glyphosate and *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis; with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview, *Journal of Environmental Quality*, v. 33 (2004), pp. 825-831.
- S. Eker, L. Ozturk, A. Yazici, B. Erenoglu, V. Romheld, I. Cakmak, Foliar-Applied Glyphosate Substantially Reduced Uptake and Transport of Iron and Manganese in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54 (2006), pp 10019-10025.
- T. Yamada, P.R. Castro, Efeitos do glyphosate nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas, *Informações Agrônômica*, v. 119 (2007), pp. 1-24.
- U. Rascher, M. Liebig, U. Lüttge, Evaluation of instant lightresponse curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field, *Plant Cell Environmental*, v. 23 (2000), pp. 1397-1405.
- W. Bilger, O. Björkman, Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*, *Photosynthesis Research*, v. 25 (1990), pp. 73-185.
- W. Bilger, U. Schreiber, M. Bock, Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field, *Oecologia*, v. 102 (1995), pp. 425-432.

Z. Qiub, L. Wanga, Q. Zhou, Effects of bisphenol A on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in above-ground organs of soybean seedlings, *Chemosphere*, v. 90 (2013), pp. 1274-1280.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, FAPEG, FINEP, IFGoiano – Campus Rio Verde, e ao CNPq, por meio do Sisbiota pelo apoio financeiro.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES NO TEOR DE CARBOIDRATOS E ÁCIDO CHIQUÍMICO PROMOVIDAS PELO GLYPHOSATE EM PLANTAS *DE Pouteria* *torta* (Mart.) Radlk

(Normas de acordo com a revista *Pesticide Biochemistry and Physiology*)

RESUMO

Os efeitos deletérios dos herbicidas geralmente são avaliados por mudanças na atividade metabólica e, apesar de sua grande utilização no mercado mundial, a relação entre o glyphosate e essas alterações são pouco documentadas. Diante disso objetivou-se com o presente estudo avaliar se o glyphosate promove alterações visuais, no teor de açúcares e nas taxas respiratórias, além da inibição da enzima EPSPs de plantas de *Pouteria torta* Mart. Radlk. As doses de glyphosate utilizadas foram: 0 (controle), 25, 50, 100, 200, 400, 800 e 1200 g e.a. ha⁻¹. Foram realizadas a determinação de açúcares redutores, açúcares não redutores, açúcares solúveis totais, amido, avaliações da taxa respiratória, do teor de ácido chiquímico e, análise visual. O glyphosate promoveu clorose com início de necrose em folhas jovens de *P. torta*, juntamente com aumento no teor de todos os carboidratos avaliados e também no teor de ácido chiquímico. No entanto, não promoveu alterações na taxa respiratória. O acúmulo de carboidratos possivelmente ocorreu em função dos efeitos deletérios do glyphosate nos órgãos drenos afetando o transporte através do floema. O alto teor de ácido chiquímico confirma o efeito do glyphosate na inibição da atividade da EPSPs.

Palavras-chave: açúcares, EPSPs, herbicidas, metabolismo, taxa respiratória.

1. Introdução

Nos últimos anos, a agricultura proporcionou crescimento expressivo do Produto Interno Bruto Brasileiro, com expansão de 9,7% no ano de 2013 em relação ao mesmo período do ano anterior (IBGE, 2013). Dentre as regiões agricultáveis, o Cerrado se destaca pela produção em grande escala de grãos, entre eles: soja, milho, algodão e sorgo. O aumento da produção agrícola acarreta maior utilização de agroquímicos, com intensificação no uso de herbicidas (TILMAN et al., 2001).

A utilização de herbicidas se tornou uma das atividades humanas mais impactantes ao meio ambiente, causando danos a organismos não alvos por meio do processo de deriva, que muitas vezes não são compreendidos e nem estudados (POWER et al., 2013; BOUTINA et al., 2014; MARWITZ et al., 2014).

Os herbicidas atuam inibindo sistemas enzimáticos ou proteínas específicas das plantas (COLE et al., 2000), e os seus efeitos deletérios geralmente são precedidos por mudanças no metabolismo, porém não se conhece precisamente os fatores que levam a morte das plantas.

Dentre os herbicidas, o mais utilizado é o glyphosate (SIHTMÄE et al., 2013; BOHN et al., 2014). A utilização do glyphosate foi intensificada a partir da geração de plantas geneticamente modificadas que são tolerantes a este herbicida, conforme previa Ulanova et al., 2009. O glyphosate é um herbicida de amplo espectro, que é utilizado para o controle de plantas daninhas (JIANGA et al., 2013). Esse herbicida atua inibindo a sintase do 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSPs), uma enzima chave na via para a biossíntese dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) (MEIOS e KREMER, 2007), os quais são precursores de outros produtos, como lignina, alcaloides,

flavonoides e ácidos benzoicos (AMARANTE JUNIOR, 2002; OLESEN e CEDERGREEN, 2010). A ação tóxica do glyphosate, com efeitos em diversas rotas metabólicas, como a inibição da EPSPs e acúmulo de ácido chiquímico (ROMAN et al., 2007; ORCARAY et al., 2010), ocasiona a morte das plantas em uma a duas semanas após o tratamento (ROJANO-DELGADO et al., 2012).

Embora o mecanismo de ação deste herbicida seja conhecido, ainda não é claro como o glyphosate realmente controla as plantas daninhas (GOMES, 2011; ORCARAY et al., 2012). Neste contexto, avaliações bioquímicas e fisiológicas podem contribuir para a elucidação das alterações do metabolismo causadas pelo glyphosate.

Além da inibição da enzima EPSPs, alvo primário da ação do glyphosate, a morte das plantas também está associada a desregulação no fluxo de carbono, falhas na produção de compostos secundários e redução na síntese de proteínas (GOMES, 2011; ORCARAY et al., 2012). Diante do exposto, objetivou-se neste estudo avaliar se, além da inibição da enzima EPSPs, o glyphosate causa danos morfológicos nas folhas e promove alterações no teor de açúcares, nas taxas respiratórias de plantas de *Pouteria torta* Mart. Radlk.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal e as condições experimentais

Os frutos de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. foram coletados no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde - GO, Brasil, despolidos em peneira e as sementes lavadas e secas em local ventilado e sombreado, sendo posteriormente semeadas em areia. Após 60 dias, as plantas jovens foram transferidas para vasos de polietileno contendo 10 kg de substrato preparado a partir da mistura de duas partes de solo do tipo latossolo vermelho distroférico típico e uma parte de areia. De acordo com a análise química do solo, o substrato utilizado possui as seguintes características: pH em H₂O de 6,3; 0,7 mg/dm⁻³ de P; 8 mg/dm⁻³ de K; 1,2 cmolc/dm⁻³ de Ca; 0,2 cmolc/dm⁻³ de Mg; 0,6 cmolc/dm⁻³ de H+Al; 11,0 g kg⁻¹ de matéria orgânica e 68% de saturação por bases O substrato, em cada vaso, foi adubado com 1,525 g de ureia; 1,175 g de K₂O; 6,9 g de P₂O₅ e 0,4 g de micronutrientes (Fritted Traced Elements[®]), São Paulo, Brasil).

Plantas com 16 meses de idade foram selecionadas quanto ao tamanho e vigor e transferidas para casa de vegetação, 30 dias antes da imposição dos tratamentos para aclimatização.

Os tratamentos constituíram da aplicação do herbicida glyphosate (Roundup Transorb[®], sal de isopropilamina com 480 g L⁻¹ do equivalente ácido) nas seguintes doses: 0, (controle), 25, 50, 100, 200, 400, 800 e 1200 g e.a. ha⁻¹. As aplicações do herbicida foram realizadas utilizando pulverizador costal (Herbicat[®], Catanduva, Brasil) com pressão constante mantida por CO₂ comprimido, munido de barra com quatro pontas de pulverização e bico (Teejet), tipo leque modelo XR110/02VP. A pressão de serviço utilizada foi de 5 kgf cm⁻², proporcionando um volume de calda de 180 L ha⁻¹.

2.2. Sintomas visuais de toxicidade do glyphosate

Foram realizadas imagens (Máquina Fujifilm FinePix SL300[®] São Paulo Goiânia, Brasil) das folhas jovens de *P. torta*, as 240 horas após aplicação do glyphosate, a fim de verificar mudanças visuais provocadas pelo efeito do herbicida.

2.3. Determinação dos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, açúcares não redutores e amido.

Após 240 horas da aplicação do glyphosate procedeu-se à coleta de 1,0 g de folhas frescas e totalmente expandidas, as quais foram mantidas em frascos âmbar, com volume de 25 mL, e cobertas totalmente com etanol 80%, previamente aquecido a temperatura de 65 – 70 °C. Após 30 minutos em temperatura ambiente, os frascos foram transferidos para geladeira, em que permaneceram até extração. A extração dos açúcares foi realizada por meio da maceração das amostras em etanol 80%, seguido de três filtrações sucessivas em papel filtro. O filtrado obtido foi completado para 25 mL com etanol 80% e, os resíduos foram secos em estufas (Modelo SP-102[®], São Paulo, Brasil), a 65°C, durante 72 h, sendo posteriormente utilizados para a determinação do teor de amido. A determinação dos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido foram realizadas utilizando espectrofotômetro UV – VIS modelo Evolution 60S (Thermo Fischer Scientific[®], Madison, Estudos Unidos).

2.3.1. Determinação dos teores de açúcares solúveis totais

Para a quantificação de açúcares solúveis totais foi empregado o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), ao comprimento de onda de 490 nm, utilizando uma curva padrão de sacarose (1%).

2.3.2. Determinação dos teores de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados conforme método do ácido dinitrosalicílico, segundo Miller, (1959), ao comprimento de onda de 540 nm, utilizando uma curva padrão de glicose (1%).

2.3.3. Determinação dos teores de açúcares não redutores

Os açúcares não redutores foram estimados pelas diferenças entre os teores de açúcares solúveis totais e redutores.

2.3.4. Determinação de amido

O amido foi determinado segundo McCready et al., (1950) ao comprimento de onda de 490 nm, utilizando uma curva padrão de sacarose (1%) de intervalo de 0 a 50 µg.

As análises de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido foram realizadas em duplicatas e, a partir dos valores, foram efetuados os cálculos e os resultados expressos em porcentagem (%), utilizando a equação proposta por Nelson, (1944); Somogy, (1945), sendo:

$$\% = ((L \times n \times v) / (MF)) \times 100, \text{ em que:}$$

% = porcentagem de carboidratos da amostra;

L = concentração da amostra obtida pela leitura do espectrofotômetro (g mL⁻¹);

n = número de diluições, caso existir;

v = volume final do extrato bruto;

MF = massa fresca.

2.4. Medição da taxa respiratória

Para a avaliação da taxa respiratória ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) das plantas de *P. torta* foi utilizado um analisador automático de fotossíntese modelo LI-6400XTR (Licor[®], Nebraska, Estados Unidos), sendo realizadas entre 04h e 05h30min da manhã, em uma folha completamente expandida e totalmente no escuro. As avaliações foram realizadas nos seguintes tempos: 24, 72, 120, 168 e 240 horas após a aplicação do herbicida.

2.5. Determinação do teor de ácido chiquímico

Para a análise do ácido chiquímico foram coletados oito discos foliares de seis mm (± 25 mg) da segunda folha abaixo do meristema apical de cada planta, às 2, 6, 24, 48, 72, 120, 168 e 216 horas após a aplicação do herbicida. As amostras coletadas foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da extração.

2.5.1. Extração

A extração do ácido chiquímico foi realizada conforme método descrito por Singh e Shaner (1998), com modificações. As amostras congeladas foram maceradas em eppendorf contendo HCl (0,25 N), na relação 1:10 [massa do tecido (g) / volume de HCl 0,25 N (mL)]. O extrato foi centrifugado a 15.000 g, a temperatura de 4°C durante 25 minutos, coletando o sobrenadante para a quantificação do ácido chiquímico.

2.5.2. Determinação de ácido chiquímico

A determinação do ácido chiquímico foi efetuada segundo método proposto por Gaitonde e Gordon (1957) e Perez-Jones et al. (2005), com modificações. Foi coletada uma alíquota de 30 μL do sobrenadante, transferido para eppendorf, e foram adicionados 500 μL de ácido periódico a 1%. Logo após, esse material foi colocado em banho-maria a 37°C por 45 min. Ao retirar as amostras do banho acrescentou-se 500 μL de hidróxido de sódio (1 N) e 300 μL de glicina (0,1 M). Em seguida, a solução foi homogeneizada e se efetuaram as leituras a 380 nm, em espectrofotômetro UV – VIS modelo Evolution 60S (Thermo Fischer Scientific[®], Madison, Estados Unidos), e os resultados expressos em mg g^{-1} MF, realizados através do coeficiente de absorvidade.

2.6. A análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos aos acaso, com 4 repetições. A análise do teor de açúcares redutores, açúcares não redutores, açúcares solúveis totais e amido foi realizada em delineamento inteiramente casualizado com 8 doses e 4 repetições. A taxa respiratória foi avaliada em esquema fatorial de 8 (doses) x 5 (tempos de avaliação), totalizando 160 unidades experimentais. A variável ácido chiquímico também foi avaliada em esquema fatorial de 8 (doses) x 8 (tempos de avaliação), totalizando 256 unidades experimentais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ajustados aos modelos de regressão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Sistema de Análises Estatísticas Gerais (SAEG 9.0 – UFV, Viçosa) e para a confecção dos gráficos foi utilizado o software SigmaPlot V.10 (SPSS Inc., USA).

3. Resultados

3.1. Sintomas visuais de toxicidade do glyphosate

Nas folhas das plantas de *P. torta* foram observadas cloroses, com início de necrose, principalmente nas concentrações mais elevadas de glyphosate (Fig. 1). A clorose ocorreu nas regiões internervais e marginais das folhas, com expansão para a nervura central, e a necrose foi observada, principalmente, nas margens e ápices foliares.

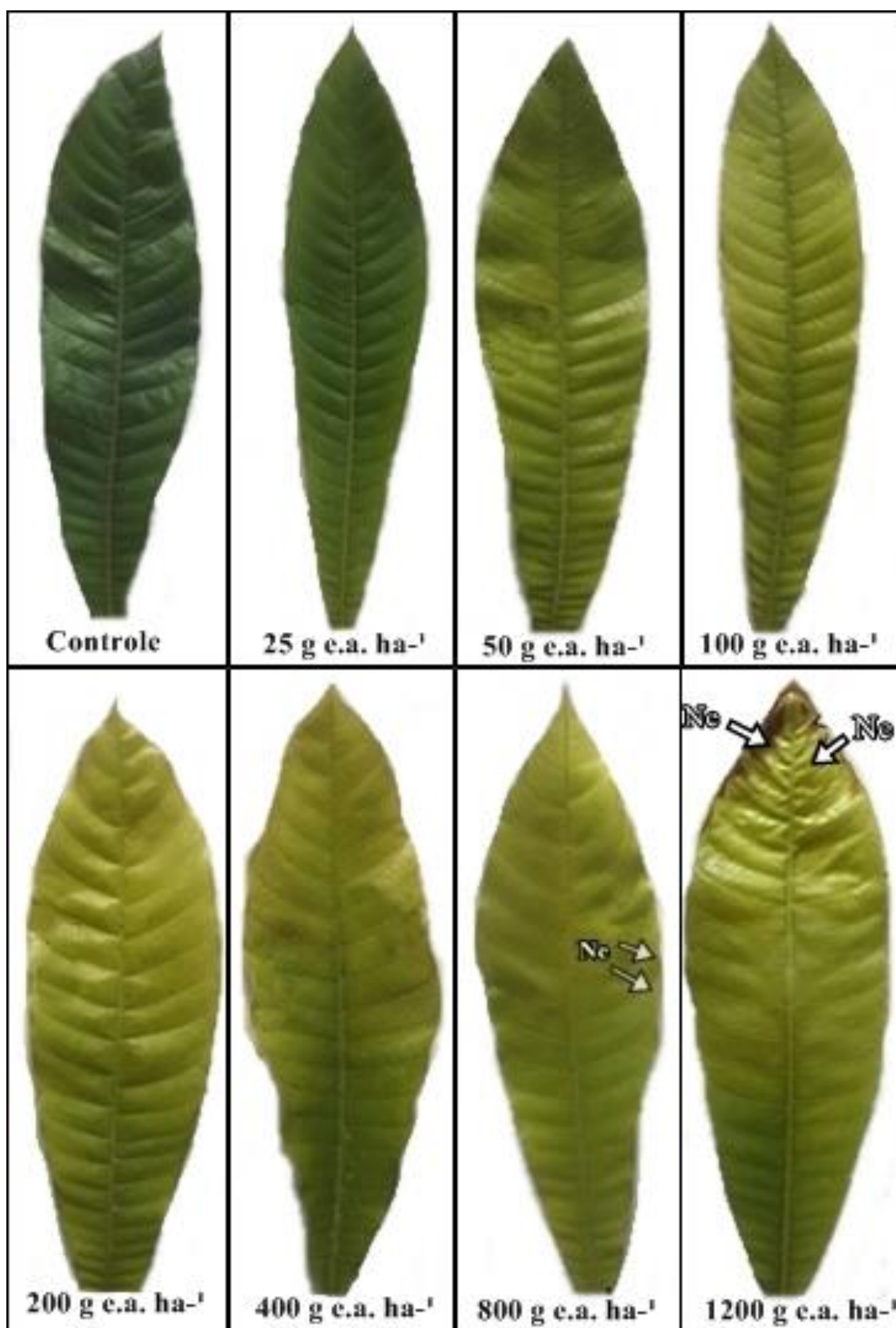


Fig. 1. Sintomas visuais da toxicidade do glyphosate em folhas jovens de *P. torta* tratadas com doses crescentes do herbicida. Legenda: Ne (Necroses).

3.2. Teores de açúcares e amido em plantas de *P. torta*.

Em função das doses do glyphosate, ocorreu aumento de até 90% no teor de açúcares solúveis totais (Fig. 2A), de até 108 no teor de açúcares não redutores (Fig. 2B) e, de até 62% no teor de açúcares redutores (Fig. 2C). Também o teor de amido aumentou em função das doses de glyphosate, no entanto, de forma mais pronunciada em doses de até 200 g e.a. ha⁻¹ (Fig. 2D).

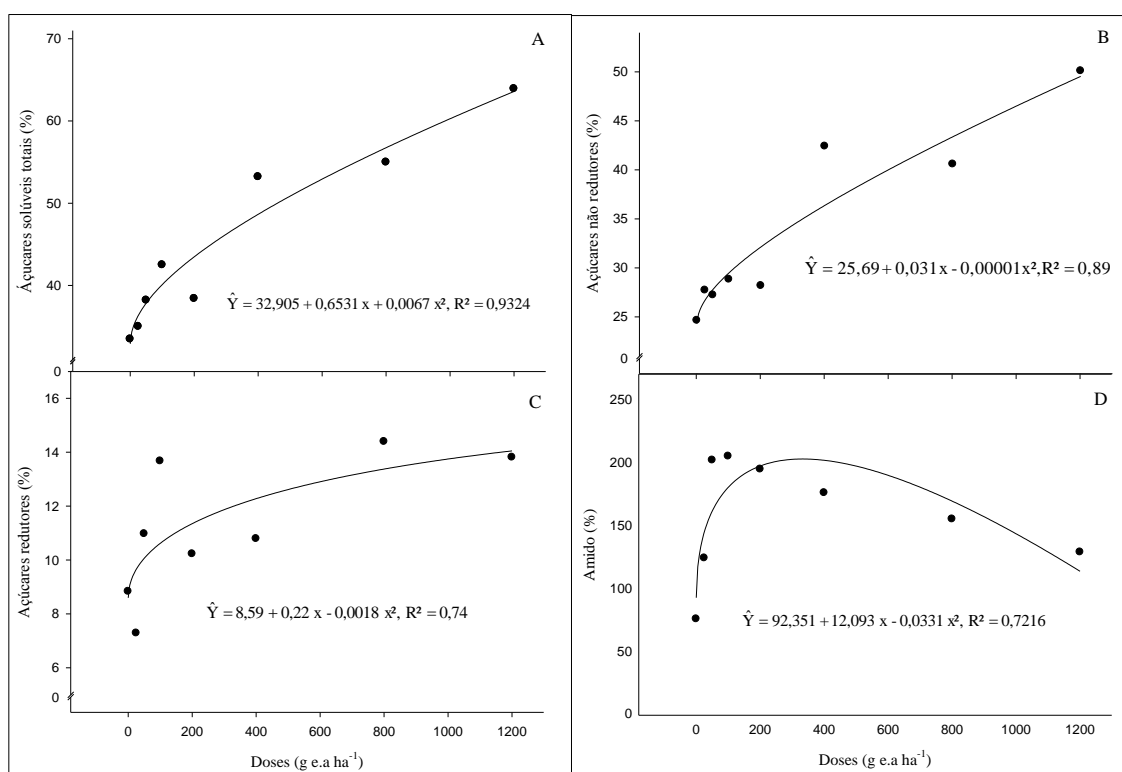


Fig. 2. Açúcares solúveis totais (A), açúcares não redutores (B), Açúcares redutores (C) e amido (D), em plantas de *P. torta* tratadas com doses crescentes de glyphosate ($n=32$).

3.3. Taxa respiratória

A taxa respiratória de plantas de *P. torta* se manteve estável durante todo período experimental, mesmo nas plantas tratadas com o glyphosate (Fig. 3).

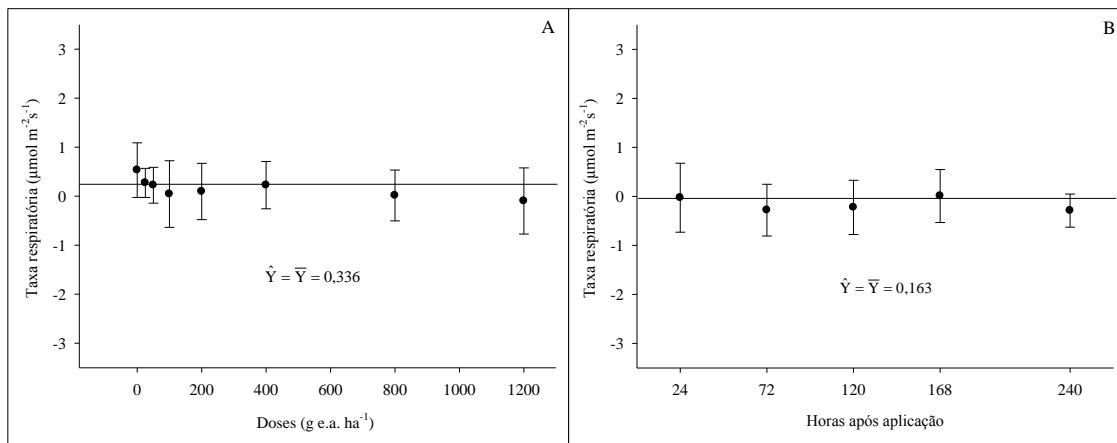


Fig. 3. Taxa respiratória em plantas de *P. torta* tratadas com doses crescentes de glyphosate ($n=32$) (A) e das horas após aplicação ($n=20$) (B). As barras na vertical representam o erro padrão da média.

3.4. Teor de ácido chiquímico em plantas de *P. torta*.

O teor de ácido chiquímico aumentou em função das doses de glyphosate, atingindo acréscimo de 40% na maior dose (Fig. 4A), no entanto, independente da dose, esse acréscimo foi observado a partir de 120 horas após aplicação do glyphosate (Fig. 4B), constituindo acúmulo superior a 70% as 216 horas após aplicação.

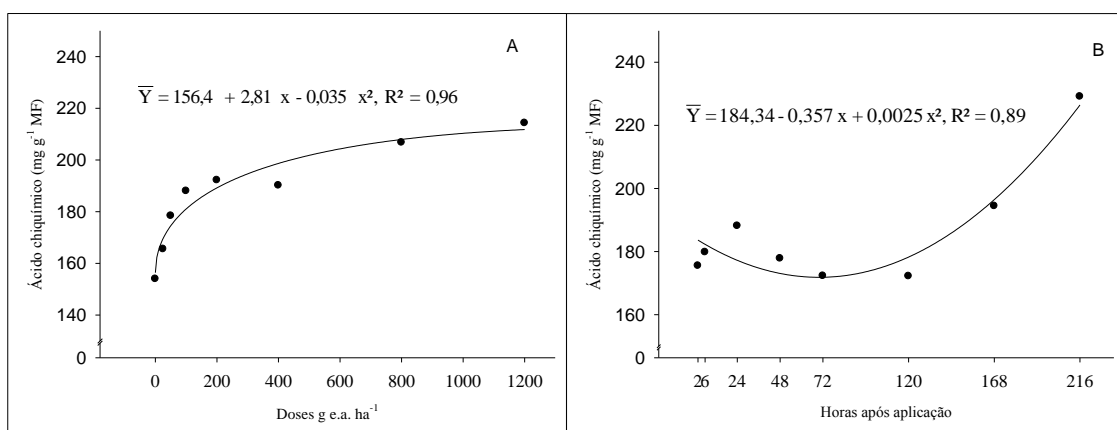


Fig. 4. Ácido chiquímico em plantas de *P. torta* tratadas com doses crescentes de glyphosate ($n=32$) (A) e das horas após aplicação ($n=20$) (B).

4. Discussão

O glyphosate promove alterações morfológicas e metabólicas nas plantas e, em *P. torta*, os sintomas visíveis de toxicidade foram cloroses, seguidas de necrose nas folhas jovens. O glyphosate se acumula, preferencialmente, nas regiões meristemáticas, induzindo a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, ao reagirem com os ácidos graxos insaturados das membranas, levam à peroxidação lipídica (LUKATKIN et al., 2013; CHANG et al., 2013). A condição de estresse oxidativo provoca o rompimento da parede periclinal externa da epiderme, colapso de tecidos mais internos, como o colênquima, juntamente com a degeneração dos cloroplastos e, ou inibição da formação da clorofila (SANTOS et al., 2008), ocasionando a morte da planta em alguns dias ou semanas.

A quantidade de açúcares translocado influencia o movimento do glyphosate, porque o herbicida é rapidamente conjugado aos açúcares por meio de pontes glicosídicas, processo esse catalisado pela enzima glicosiltransferase (COLEN, 1994; MONQUERO et al., 2004). Após a conjugação, o herbicida segue a mesma rota dos produtos finais da fotossíntese, ou seja, das folhas fotossinteticamente ativas para os órgãos drenos (CASELEY e COUPLAND, 1985). O glyphosate é transportado através das células por carreadores de fosfato da membrana plasmática (CONCENÇO et al., 2007) e, por meio dos plasmodesmos, via simplasto (SAMMONS e GAINES, 2014), atingindo rapidamente todas as células.

O aumento do teor de açúcares observados nas folhas, em função das doses do glyphosate, pode estar associado a alterações no transporte pelo floema em que o teor de carboidratos transportados, a partir dos órgãos-fonte, ocorrendo elevação maior que os órgãos-dreno são capazes de metabolizar (ORCARAY et al., 2012). Os sintomas de toxidez observados nas regiões meristemáticas das plantas de *P. torta* evidenciaram que atividade metabólica dos órgãos-dreno foi comprometida pelo herbicida e, sob essas condições, o gradiente de pressão osmótica exigido para o transporte a longa distância é anulado, uma vez que o transporte no floema é inibido pela redução da força de dreno (GONÇALVES et al., 2005; BERGER et al., 2007). Resultados semelhantes com glyphosate foram observados em plantas de ervilha (ORCARAY et al., 2012); em plantas de *Lolium perenne*, obtendo aumento pronunciado tanto de açúcares totais, quanto redutores (YANNICARIA et al., (2012) e em *Zea mays in vitro*, com o aumento também de açúcares redutores como glicose, sorbose, frutose e galactose (ULANOV et al., 2009).

Normalmente, o maior teor de açúcares produzidos na fotossíntese promove, também, aumento da taxa respiratória, tendo em vista a maior disponibilidade de substrato para as enzimas da via glicolítica (RODRIGUES, 2009). No entanto, o maior teor de açúcares nas folhas de *P.torta* tratadas com glyphosate não promoveu alterações na taxa respiratória como, também, observado por Sprankle et al. (1975) em plantas de trigo. O aumento da taxa respiratória, nos casos em que ocorre, é atribuído a intensificação da atividade metabólica associada aos processos de desintoxicação como a inativação, compartimentação, degradação do herbicida, entre outros. (CEDERGREEN e OLESEN, 2010). Dentre os processos de desintoxicação se destaca a degradação do glyphosate em ácido aminometilfosfônico (AMPA) e glioxialato, reação catalisada pela enzima glyphosate desidrogenase (GOX) (REDDY et al., 2008; ROJANO-DELGADO et al., 2012).

Alterações metabólicas decorrentes de doses crescentes de glyphosate, como o aumento do teor de ácido chiquímico (AC) nas plantas de *P. torta* é resposta típica do efeito tóxico desse herbicida (MATTALLO et al., 2009; GONZÁLEZ-TORRALVA, et al., 2012; YANNICARIA et al., 2012). Isso ocorre pela ação do glyphosate sobre a enzima EPSPs na rota do ácido chiquímico (CARVALHO, e al., 2012).

A síntese do ácido chiquímico consiste na condensação do fosfoenolpiruvato, resultante da glicólise, e da eritrose-4-fosfato, resultante da via da pentose-fosfato (YAMADA e CASTRO, 2007), o ácido chiquímico formado reage com fosfoenolpiruvato (PEP), processo catalisado pela enzima EPSPs, formando 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e fósforo inorgânico (FRANZ et al., 1997). Essa reação ocorre através da ligação da enzima EPSPs ao AC, formando o complexo EPSPs-AC, em que posteriormente o PEP se liga a esse complexo. O glyphosate se liga ao complexo EPSPs-AC, competindo com o PEP, pois sua afinidade com o complexo é 75 vezes maior do que a do PEP. A ligação do glyphosate à EPSPs ocorre possivelmente em um sítio alostérico, resultando em alterações estruturais do sítio de ligação da PEP (READE e COBB, 2002), que por sua vez promove a inibição da síntese do corismato, e posteriormente dos aminoácidos aromáticos. Nesse sentido, é esperado que a inibição da EPSPs de fato promova o aumento do teor de ácido chiquímico como foi observado neste estudo (Fig. 5).

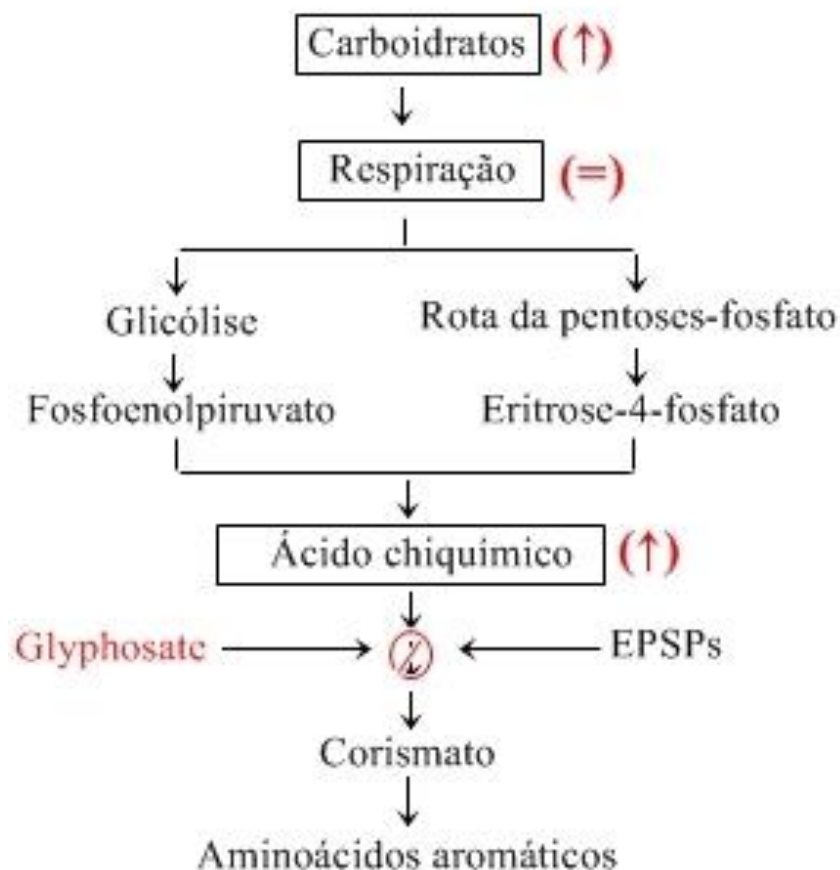


Fig. 5. Visão geral dos efeitos no metabolismo de plantas de *Pouteria torta* Mart. Radlk decorrentes de alterações bioquímicas diante da ação do glyphosate. Seta entre parênteses (↑) simboliza o aumento do produto. Igual entre parênteses (=) simboliza normalidade.

Tomados em conjunto, esses resultados demonstraram que a ação tóxica do glyphosate nas regiões meristemáticas de plantas de *P. torta* afetaram o transporte de carboidratos no floema e, em consequência, ocorreu acúmulo de carboidratos nas folhas. O processo respiratório, por sua vez, não sofreu alteração, sendo possível manter a rota de biossíntese do ácido chiquímico. Como o glyphosate provoca a inibição da ação da enzima EPSPs, que utiliza o AC como substrato, a manutenção da síntese de AC resultou em seu acúmulo nas folhas.

6. Conclusões

A ação tóxica do glyphosate resultou em danos morfológicos como clorose e necrose, nas folhas jovens de *Pouteria torta* Mart. Radlk. Em termos metabólicos,

ocorreu acúmulo de carboidratos e de ácido chiquímico nas folhas expandidas. O elevado teor de ácido chiquímico confirma o efeito do glyphosate na inibição da atividade da EPSPs.

7. Referências bibliográficas

- A. M. Rojano-Delgado, H. Cruz-Hipolito, R. Prado, M. D. L. Castro, A. R. Franco, Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. *utilis* plants, *Phytochemistry*, v. 73 (2012), pp. 34-41.
- A. Marwitz, E. Ladewig, B. Märlander, Response of soil biological activity to common herbicide strategies in sugar beet cultivation, *European Journal of Agronomy*, v. 54 (2014), pp. 97-106.
- A. Perez-Jones, A. Park, J. Colquhoun, C. Mallory-Smith, D. Shaner, Identification of glyphosate resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon, *Weed Science*, v. 53 (2005), pp. 775-779.
- A. S. Lukatkin, A. N. Gar'kova, A. S. Bochkaryova, O. V. Nushtaeva, J. A. T. Silva, Treatment with the herbicide TOPIK induces oxidative stress in cereal leaves, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 105 (2013), pp. 44-49.
- A. Ulanova, A. Lygina, D. Duncanb, J. Widholma, V. Lozovayaa, Metabolic effects of glyphosate change the capacity of maize culture to regenerate plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 166 (2009), pp. 978-987.
- B. K. Singh, D. L. Shaner, Rapid Determination of Glyphosate Injury to plants and Identification of Glyphosate-Resistant Plants, *Weed Technology*, v. 12 (1998), pp. 527-530.
- C. Boutina, B. Strandbergb, D. Carpentera, S. K. Mathiassenc, P. J. Thomasa, Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications? *Environmental Pollution*, v.185 (2014), pp. 295-306.
- C. F. Olesen, N. Cedergreen, Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence, *Pest Management Science*, v. 66 (2010), pp. 536-542.
- D. Cole, K. Pallet, M. Rodgers, Discovering new modes of action for herbicides and the impact of genomics, *Pesticide Outlook*, v. 11 (2000), pp. 223-229.

- D. J. Colen, D. J. Detoxification and activation of agrochemicals in plants, *Pesticide Science*, v. 42 (1994), pp. 209-222.
- D. Tilman, J. Fargione, B. Wolff, C. D'antonio, A. Dobson, R. Howarth, D. Schindler, W. H. Schlesinger, D. Simberloff, D. Swackhamer, Forecasting agriculturally driven global environmental change, *Science*, v. 292 (2001), pp. 281-284.
- E. F. Power, D. L. Kelly, J. C. Stout, The impacts of traditional and novel herbicide application methods on target plants, non-target plants and production in intensive grasslands. *Weed Research*, v. 53 (2013), pp. 131-139.
- E. Roman, H. Beckie, L. Vargas, L. Hall, M. Rizzardi, T. M. Wolf, Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação. Passo Fundo, (livro) Gráfica Editora Berthier, (2007), pp.160.
- F. González-Torralva, A. M. Rojano-Delgado, M. D. L. Castro, N. Mülleder, R. Prado, Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes, *Journal of Plant Physiology*, v. 169 (2012), pp. 1673-1679.
- G. Concenço, E. A. Ferreira, F. A. Ferreira, J. B. Santos, Plasmodesmata: symplastic transport of herbicides within the plant, *Planta Daninha*, v. 25 (2007) pp. 423-432.
- G. L. G. C. Gomes, Alterações metabólicas de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito. Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP (*Dissertação*), (2011), pp.97.
- G. Miller, Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars, *Analytical Chemistry*, v. 31 (1959), pp. 426-428.
- H. L. Chang, C. Y. Kang, T. M. Lee, Hydrogen peroxide production protects *Chlamydomonas reinhardtii* against light-induced cell death by preventing singlet oxygen accumulation through enhanced carotenoid synthesis, *Journal of plant physiology*, v. 170 (2013), pp. 976-986.
- J. C. Caseley, D. Coupland, Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake movement and acidity. In: E. Grossbard, D. A. Atkinson, (Ed.), *The herbicide glyphosate*. London: Butterworths, (1985), pp. 92-123.
- J. D. Rodrigues, Absorção e transporte de solutos nas plantas. In: VELINI, E. D. *Glyphosate*. Botucatu: Fepaf, (2009), 493 p.
- J. E. Franz, M. K. Mao, J. A. Sikorski, Glyphosate: a unique global herbicide, *American Chemical Society*, (1997). 678 p.

- J. P. H. Reade, A. H. Cobb, Herbicides: modes of action and metabolism. In: R. E. L. Naylor, Weed management handbook, *Blackwell Science: Oxford*, (2002), pp. 134-170.
- K. .N. Reddy, A. M. Rimando, S. O. Duke, V. K. Nandula, Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate, *Journal Agric. Food Chemistry*, v. 56 (2008), pp. 2125-2130.
- L. B. Carvalho, P. L. C. A. Alves, F. Gonzalez-Torralva, H. E. Cruz-Hipolito, A. M. Rojano-Delgado, R. Prado, J. Gil-Humanes, F. Barro, M. D. L. Castro, Pool of Resistance Mechanisms to Glyphosate in *Digitaria insularis*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60 (2012), pp. 615-622.
- L. D. T. Santos, B. F. Sant'anna-Santos, R. M. S. Meira, R. A. S. Tiburcio, F. A. Ferreira, C. A. D. Melo, E. F. S. Silva, Visible and anatomic damages caused by glyphosate in *Eucalyptus grandis* leaves, *Planta Daninha*, v. 26 (2008), pp. 9-16.
- L. Orcaray, A. Zulet, A. Zabalza, M. Royuela, Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate, *Journal Plant Physiology*, v. 169 (2012), pp.27-33.
- L. Orcaray, M. Igal, D. Marino, A. Zabalza, M. Royuela, The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors, *Pest Management Science*, v. 66 (2010), pp. 262-269.
- L. X. Jianga, L. G. Jina, Y. Guoa, B. Taoc, L. J. Qiu, Glyphosate effects on the gene expression of the apical bud in soybean (*Glycine max*), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 437 (2013), pp. 544-549.
- M. B Matallo, S. D. B. Almeida, A. L. Cerdeira, D. A. Franco, F. M. G. Blanco, P. T. C. Menezes, L. C. Luchini, M. A. M. Moura, S. O. Duke, Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues, *Planta Daninha*, v. 27 (2009), pp. 987-994.
- M. C. Gonçalves, J. Vega, J. G. Oliveira, M. M. A. Gomes, Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves, *Fitopatologia Brasileira*, v. 30 (2005), pp.10-16.
- M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28 (1956), pp. 350-356.
- M. Gaitonde, M. Gordon, A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 230 (1957), pp. 1043-1050.

- M. Sihtmäe, I. Blinova, K. Künnis-Beres, L. Kanarbik, M. Heinlaan, A. Kahru, Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations, *Applied Soil Ecology*, v. 72 (2013), pp.215-224.
- M. Somogy, A new reagent for the determination of sugars, *Journal of Biological Chemistry*, v. 160 (1945) pp. 61-68.
- M. Yanniccari, C. Istilart, J. O. Giménez, H. Acciaresi, A. M. Castro, Efecto del glyphosate sobre el crecimiento y acumulación de azúcares libres en dos biotipos de *Lolium perenne* de distinta sensibilidad al herbicida, *Plantas daninhas*, v. 30, (2012), pp. 155-164.
- N. Cedergreen, C. F. Olesen, Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 96 (2010), pp. 140-148.
- N. E. Meios, R. J. Kremer, Influência da umidade do solo na colonização radicular de soja tratadas com glyphosate por *Fusarium* espécies, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 38 (2007), pp. 1713-1720.
- N. Nelson, A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose, *Journal of Biological Chemistry*, v. 153 (1944), pp. 375-80.
- O. P. Amarante Junior, T. C. R. Santos, N. M. Brito, M. R. Ribeiro, Glyphosate: properties, toxicity, use and legislation, *Química Nova*, v. 25 (2002), pp. 589-593.
- P. A. I. Monquero, P. J. Christoffoleti, M. D. Osuna, R. A. De Prado, Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida, *Planta Daninha*, v. 22 (2004), pp. 445-451.
- P. Sprankle, W. F. Meggitt, D. Penner, Absorption, action, and translocation of glyphosate, *Weed Science*, v. 23 (1975), pp. 235-240.
- Produto Interno Bruto, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (2013) Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/pib/defaultcnt.shtm> Acessado: 23/01/2014.
- R. D. Sammons, T.A. Gaines, Glyphosate resistance: State of knowledge, *Pest Management Science*, v. x (2014), pp. x-x.
- R. M. Mccready, J. Guggolz, V. Silveira, Determination of starch and amylase in vegetables, *Analytical Chemistry*, v. 22 (1950), pp. 1156-1158.
- S. Berger, A. K. Sinha, T. Roitsch, Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions, *Journal of Experimental Botany*, v. 58 (2005) pp.4019-4026.

T. Bohn, M. Cuhra, T. Traavik, J. Fagan, R. Primicerio Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans *Food Chemistry*, v. 153 (2014), pp. 207-215.

T. Yamada, P.R. Castro, Efeitos do glyphosate nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas, *Informações Agronômica*, v. 119 (2007), pp. 1-24.

Agradecimentos

A CAPES, FAPEG, FINEP, IFGoiano – Campus Rio Verde, e ao CNPq, por meio do Sisbiota pelo apoio financeiro.

CONCLUSÃO GERAL

O glyphosate promoveu efeitos em plantas de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk., como clorose, necrose e um alto teor de ácido chiquímico nas folhas jovens, juntamente com acúmulo de carboidratos nas folhas expandidas. Além de redução das trocas gasosas, da fluorescência da clorofila *a*, e do teor de pigmentos em folhas expandidas das plantas.

Os resultados deste estudo demonstram que em folhas de plantas de *P. torta*, os sintomas visuais, as alterações na condutância estomática e o acúmulo de ácido chiquímico, são bons biomarcadores da ação do glyphosate.