

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

**BIOMARCADORES E POTENCIAL FITOINDICADOR DE  
*Dipteryx alata* Vogel DA AÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E  
NICOSULFURON**

Autora: Fábيا Barbosa da Silva

Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

Rio Verde - GO  
Fevereiro – 2015

Barbosa da Silva, Fábía

B238b Biomarcadores e potencial fitoindicador de *Dypteryx alata* da ação dos herbicidas 2,4-D e Nicosulfuron / Fábía Barbosa da Silva. – Rio Verde. – 2015.  
59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde, 2015. Orientador: DSc. Alan Carlos Costa.

#### Bibliografia

1. Fitoindicação. 2. Fotossíntese. 3. Estresse oxidativo. 4. Risco ambiental. 5. Defensivos agrícolas. I. Título. II. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

CDD: 632-95

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 E POTENCIAL FITOINDICADOR  
DE *Dipteryx alata* Vogel DA AÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D  
E NICOSULFURON**

Autora: Fábيا Barbosa da Silva  
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 2015.

Prof. Dr. Cleberson Ribeiro  
Avaliador externo  
UFV/MG

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

Dra. Kelly Julianne Telles do  
Nascimento  
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 E POTENCIAL FITOINDICADOR DE  
*Dipteryx alata* Vogel DA AÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E  
NICOSULFURON**

Autora: Fábيا Barbosa da Silva

Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

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

Rio Verde - GO  
Março - 2015

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, força, oportunidades e pelos amigos conquistados.

Aos meus pais, pelo amor eterno, aconchego, exemplos de sabedoria, paciência, dedicação, perseverança, doação, incentivo e pelo apoio incondicional, com certeza minha força, meu tudo.

Ao meu amado Roberto, pelo amor, dedicação, companheirismo, por me ajudar nas horas de estresses e de alegria, por tanta coisa que deixo de escrever por motivos de espaço.

A minha querida irmã, mesmo não estando tão perto me transmite amor e confiança. Aos meus sobrinhos Bruna e Brener, pelo amor incondicional. A toda minha família, pelo carinho e incentivo.

Ao meu orientador Professor Alan Carlos Costa, exemplo de dedicação, pela orientação, ensinamentos e oportunidades oferecidas. Obrigada pela confiança, apoio e pela amizade durante todos esses anos de convívio.

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

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), 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.

A minha coorientadora Professora Clarice Aparecida Megguer, pela amizade, paciência, orientação, companheirismo e pela serenidade nos momentos difíceis.

Ao meu coorientador Professor Adriano Jakelaite, pela orientação, apoio, ensinamentos, amizade e entusiasmo sempre presente, além das contribuições na banca examinadora.

Ao Professor Cleberson Ribeiro da Universidade de Federal de Viçosa, pela participação e grandes contribuições na banca examinadora.

A pós-doutora Kelly Julianne Telles do Nascimento, pelos ensinamentos técnicos e teóricos, pelas sugestões sempre oportunas e, também pelo entusiasmo e profissionalismo e, pelas contribuições na banca examinadora.

A pós-doutora Júlien Lima, pelos momentos agradáveis no laboratório, companheirismo e amizade.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Ecofisiologia - composta pela Priscila, Luciana, Jonatas, Marília, Sueisla, Verônica, Robson, Gabriel, Ailton, Yasmim, Erick, pelos agradáveis momentos que passamos juntos, pelas risadas, aprendizados pela disponibilidade e dedicação nas análises realizadas. E, a todos os colegas que já passaram no Laboratório – Karen, Fátima, Rodolfo, Gabriela, Viviane, Vanessa, Natália, Danilo, Adinan, pelos momentos juntos que deixarão saudades.

As minhas irmãs de coração Fátima, Karen e Géssica, pela amizade, lealdade, convivência, amparo em todos os momentos, principalmente nos difíceis ajudando a superar obstáculos.

Em especial, à minha amiga Priscila, pela disposição em ajudar em todos os momentos necessários para execução deste trabalho e, também, pela amizade e conselhos.

As secretárias do Instituto Federal Goiano, Vanilda e Karina, em especial, pela amizade, dedicação, competência e profissionalismo que sempre empenham em seus trabalhos e, aos demais que trabalham nas secretarias da pós-graduação pela amizade e competência.

A todos meus 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, pela dedicação e ensinamentos repassados durante toda minha jornada de acadêmica.

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

“Até aqui me ajudou o Senhor”

## BIOGRAFIA DA AUTORA

FÁBIA BARBOSA DA SILVA, filha de Florisbela Barbosa da Silva e Cacildo Moreira da Silva, nasceu no dia 19 de outubro de 1988, na cidade de Palmeiras de Goiás, Goiás.

Em fevereiro de 2009, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde - Goiás, graduando em dezembro de 2012.

Em março de 2013, 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

ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES .....	xii
RESUMO GERAL .....	1
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7
OBJETIVO .....	11
CAPÍTULO I .....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. Introdução .....	15
2. Material e métodos.....	16
2.1. Material vegetal e as condições experimentais .....	17
2.2 Imposição dos tratamentos .....	17
2.3. Avaliações Fisiológicas .....	17
2.3.1. Medições das trocas gasosas .....	18
2.3.2. Medições de fluorescência de clorofila <i>a</i> .....	18
2.3.3. Conteúdo de pigmentos cloroplastídicos e permeabilidade de membranas .....	18
2.4. Análise de sintomas visuais .....	19
2.5. Análise estatística .....	19
3. Resultados.....	19
3.1 Variáveis microclimáticas .....	19
3.2 Trocas gasosas .....	20
3.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	22
3.4. Concentração de pigmentos cloroplastídicos e taxa de liberação de eletrólitos....	24



3.5. Sintomas visuais de plantas <i>Dypteryx alata</i> .....	25
4. Discussão .....	26
5. Conclusões .....	31
6. Referências bibliográficas.....	31
CAPÍTULO II .....	36
RESUMO .....	37
ABSTRACT.....	37
Introdução .....	38
Material e Métodos .....	40
Resultados .....	44
Discussão .....	45
Conclusões .....	48
Referências.....	48
CONCLUSÃO GERAL.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I.....	12
Figura 1. Taxa fotossintética [A] (A e E), condutância estomática ( $g_s$ ) (B e F), taxa transpiratória ( $E$ ) (C e G) e relação entre a concentração interna e externa de $CO_2$ ( $C_i/C_a$ ) (D e H) de <i>Dipteryx alata</i> Vogel tratadas com doses crescentes de 2,4-D (A-D) e nicosulfuron (E-H) e avaliadas em três diferentes tempos. Os dados são médias de $n=5$ .....	21
Figura 2. Taxa respiratória de <i>Dipteryx alata</i> Vogel tratadas com doses crescentes de 2,4-D (A) e nicosulfuron (B) e avaliadas em três diferentes tempos. Os dados são médias de $n=5$ .....	222
Figura 3. Rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ) (A e E), e rendimento quântico efetivo do FSII ( $\Delta F/F_m'$ ) (B e F), taxa de transporte de elétrons ( $ETR$ ) (C e G) e <i>quenching</i> não fotoquímico (NPQ) ( $C_i/C_a$ ) (D e H) de <i>Dipteryx alata</i> Vogel, tratadas com doses crescentes de 2,4-D (A, B, C e D) e nicosulfuron (E, F, G e H) e avaliadas em três diferentes tempos. Os dados são médias de $n=5$ . ....	23
Figura 4. Teor de Clorofilas (A e B) e Carotenoides de <i>Dipteryx alata</i> Vogel, tratadas com doses crescentes dos herbicidas 2,4-D (A e C) e avaliadas às 396 (HAA), e com doses crescentes de nicosulfuron (B e D) e avaliadas às 576 (HAA). Os dados são médias de $n=5$ .....	24
Figura 5. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE %) de <i>Dipteryx alata</i> Vogel, tratadas com doses crescentes dos herbicidas 2,4-D (A) e avaliadas às 396 (HAA), e com doses crescentes de nicosulfuron (B) e avaliadas às 576 (HAA). Os dados são médias de $n=40$ .....	25
Figura 6. Ausência de sintomas visuais das folhas jovens de <i>Dipteryx alata</i> tratadas com doses crescentes de 2,4-D e avaliadas às 396 (HAA).....	26
Figura 7. Sintomas visuais das folhas jovens de <i>Dipteryx alata</i> tratadas com doses crescentes de nicosulfuron e avaliadas às 576 (HAA).....	26
CAPÍTULO II.....	36

- Figura 1. Atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) [A-B], catalase (CAT) [C-D] e ascorbato peroxidase (APX) [E-F] de *Dipteryx alata* de acordo com a interação entre as doses do 2,4-D e das horas após aplicação (A, C e E) e de acordo com a interação entre as doses do nicosulfuron e das horas após aplicação (B, D e F). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro das doses, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são média e desvio padrão de  $n= 30$ ..... 54
- Figura 2. Concentrações de peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$  de *Dipteryx alata* de acordo com a interação entre as doses do 2,4-D e das horas após aplicação (A) e de acordo com a interação entre as doses do nicosulfuron e das horas após aplicação (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro das doses, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são média e desvio padrão de  $n= 30$ ..... 54
- Figura 3. Concentrações de malondialdeído (MDA) de *Dipteryx alata* tratadas com doses do 2,4-D (A) e às horas após aplicação (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são médias e desvio padrão de  $n= 5$ ..... 54
- Figura 4. Concentrações de malondialdeído (MDA) de *Dipteryx alata*, de acordo com a interação entre as doses do nicosulfuron e das horas após aplicação. Médias seguidas da mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro das doses, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são médias e desvio padrão de  $n= 30$ .....54
- Figura 5. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE) de *Dipteryx alata*, submetidas a doses dos herbicidas 2,4-D (A) e nicosulfuron (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são médias e desvio padrão de  $n= 5$ .....54
- Figura 6. Atividade da enzima celulase de *Dipteryx alata*, de acordo com a interação entre as doses do 2,4-D e das horas após aplicação. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro das doses, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são média e desvio padrão de  $n= 30$ .....54
- Figura 7. Atividade da enzima aceto lactato sintase de *Dipteryx alata*, de acordo com a interação entre as doses do nicosulfuron e horas após aplicação. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são média e desvio padrão de  $n= 5$ .. ..... 54
- Figura 8. Ausência de sintomas visuais em folhas de plantas de *Dipteryx alata* às 96 horas após aplicação do herbicida 2,4-D. Todas as barras da figura são escala de 1 cm. .... 54
- Figura 9. Sintomas visuais em folhas de plantas de *Dipteryx alata* às 216 horas após aplicação do herbicida nicosulfuron. Todas as barras da figura são escala de 1 cm. Legenda: NC (necrose) e CL (clorose). .... 55

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES

A	Taxa fotossintética	( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
ACC	Ácido 1-aminociclopropano – 1- carboxílico	
ACX	Acil CoA – oxidase	
ALS	Aceto lactato sintase	(ABS/h)
APX	Ascorbato peroxidase	( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína)
ASH	Ascorbato	
ATP	Adenosina trifosfato	
CAT	Catalase	( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína)
CEL	Celulase	( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína)
Chl <sup>3</sup>	Clorofila tripleto	
$C_i/C_a$	Relação entre concentração interna e externa de CO <sub>2</sub>	
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	
EROS	Espécies reativas de oxigênio	
ETR	Taxa relativa de transporte de elétrons	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
FSII	Fotossistema II	
$F_v/F_m$	Rendimento quântico potencial do fotossistema II	
GPX	Peroxidase da glutathiona	
GR	Glutathiona reduase	
$G_s$	Condutância estomática	( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
GSH	Glutathiona	
GST	Glutathiona S-transferase	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio	( $\mu\text{mol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína)
HAA	Horas após aplicação	
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis	
MDA	Malonaldeído	(mmol/g Massa Fresca)
MnSOD	Suoeróxido dismutase de Manganês	
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido	
NPQ	Coefficiente de extinção não fotoquímica	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido	
Q <sub>A</sub>	Quinona A	
SAEG	Sistema de Análises Estatísticas Gerais	

TBA	Ácido tiobarbitúrico	
TCA	Ácido triclorácetico	
TLE	Taxa de liberação de eletrólitos	
U SOD	Superóxido dismutase	(min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína)
$\Delta F/F_m'$	Rendimento quântico efetivo do fotossistema II	

## RESUMO GERAL

SILVA, F. B., M. Sc., Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2015. **Biomarcadores e potencial fitoindicador de *Dipteryx alata* Vogel da ação dos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron.** Orientador: Dsc. Alan Carlos Costa. Coorientadores: Dsc<sup>a</sup>. Clarice Aparecida Megguer e Dsc. Adriano Jakelaites.

Nos últimos anos houve intenso aumento da utilização de defensivos agrícolas cujos impactos no ambiente e na saúde humana ainda são poucos reportados. Mediante a utilização de organismos indicadores é possível obter informações sobre o impacto de contaminantes no ambiente e os potenciais riscos ambientais. Nesse sentido, objetivou-se neste estudo identificar biomarcadores fisiológicos e bioquímicos que permitam avaliar o potencial fitoindicador de plantas de *Dipteryx alata* Vogel do impacto dos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron em vegetação nativa do Cerrado. Foram realizados quatro estudos para avaliar o efeito do 2,4-D e nicosulfuron nas trocas gasosas, na fluorescência da clorofila *a*, na concentração de pigmentos cloroplastídicos, na taxa de liberação de eletrólitos, atividade das enzimas do sistema antioxidante contra espécies reativas de oxigênio, seus danos celulares e, ainda, da atividade das enzimas Aceto lactato sintase e da Celulase nas plantas de *Dipteryx alata*, além da ocorrência de sintomas visuais. Os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron promoveram diminuição das trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e na concentração de pigmentos cloroplastídicos, com exceção da razão  $C_i/C_a$  que teve valores mais aumentados nas plantas tratadas com nicosulfuron. Ambos os herbicidas promoveram aumento nos valores da dissipação não fotoquímica. Além disso, nas plantas tratadas com o 2,4-D, observou-se aumento na concentração de carotenoides, sugerindo possível mecanismo

de fotoproteção. Os danos celulares nas plantas tratadas com nicosulfuron foram evidenciados por meio do aumento da taxa de liberação de eletrólitos e sintomas visuais nas plantas, e não foi observado nas plantas tratadas com o 2,4-D. A atividade das enzimas do sistema antioxidante, sobretudo catalase e ascorbato peroxidase, assim como a concentração de malonaldeído, aumentaram em resposta ao nicosulfuron, indicando o potencial destas características como biomarcadores deste herbicida. Observou-se ainda a inibição da enzima aceto lactato sintase, nas plantas tratadas com o nicosulfuron e, o aumento da atividade da enzima Celulase, por efeito do 2,4-D, que também podem ser utilizadas como biomarcadores da ação destes herbicidas. O conjunto de biomarcadores observados neste estudo nas plantas de *D. alata* constituem características importantes na classificação desta espécie como potencial fitoindicadora da ação do nicosulfuron e, como potencial fitosensora da ação do 2,4-D.

**Palavras-chave:** fitoindicação, fotossíntese, estresse oxidativo, risco ambiental, defensivos agrícolas.

## ABSTRACT

SILVA, F. B., M. Sc., Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, February 2015. **Biomarkers and phytoindicator potential of *Dipteryx alata* Vogel to 2,4-D and nicosulfuron herbicides.** Advisor: Dsc. Alan Carlos Costa. Advisors: Dsca. Clarice Aparecida Megguer and Dsc. Adriano Jakelaites.

In recent years there has been intense increase in the pesticides use whose impacts on the environment and human health are still few reported. By using indicator organisms is possible to obtain information about the environmental contaminants impact and potential risks. In this sense, the objective of this study is to identify physiological and biochemical biomarkers to assess the phytoindicators potential of *Dipteryx alata* Vogel plants of the impact of 2,4-D and nicosulfuron herbicides in native Cerrado vegetation. There were carried out four studies to evaluate the effect of 2,4-D and nicosulfuron in gas exchange, chlorophyll a fluorescence, chloroplast pigments concentration, electrolytes leakage rate, activity of enzymes from antioxidant system against reactive oxygen species, cellular damage and also the activity of Acetolactate synthase and Cellulase enzymes in *Dipteryx alata* plants, besides the occurrence of visual symptoms. The 2,4-D herbicides and nicosulfuron promoted decrease in gas exchange, chlorophyll a fluorescence and chloroplast pigments concentration, with an exception in  $C_i/C$  ratio, in which plants treated with nicosulfuron had higher values. Both herbicides promoted an increase in the values of not photochemistry dissipation. In addition, plants treated with 2,4-D, there was observed an increase in the concentration of carotenoids, suggesting a possible mechanism of photoprotection. The cellular damage in plants treated with nicosulfuron were evidenced by the increase of the electrolytes leakage rate



and visual symptoms on the plants, which was not observed in plants treated with 2,4-D. The activity of the enzymes from the antioxidant system, specially catalase and ascorbate peroxidase, as well as the concentration of malonaldehyde, increased in response to nicosulfuron, indicating the potential of these features as biomarkers of this herbicide. It was also observed to inhibition of acetolactate synthase, in plants treated with the nicolsulfuron and, the increased activity of the cellulase enzyme by the effect of 2,4-D, that may also be used as biomarkers of these herbicides action. The set of biomarkers observed in this study in *D. alata* plants are important features in the classification of this species as phytoindicator of nicosulfuron action and as potential phytosensor of 2,4-D action.

**Key words:** phytoindication, photosynthesis, oxidative stress, environmental risk, pesticides.

## INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é a maior região de savana neotropical do Mundo. Ocupa aproximadamente  $2 \times 10^6$  Km<sup>2</sup> do território brasileiro, com áreas de transição (ecótonos) com outros biomas como a Mata Atlântica, a Floresta Amazônica, a Caatinga e o Pantanal (RONQUIM *et al.*, 2009; PALHARES *et al.*, 2010).

Atualmente, o Cerrado é considerado um dos 34 locais no planeta que possuem alta biodiversidade, sendo um dos mais ameaçados (*hotspots*) (MMA/IBAMA, 2012). Uma das atividades mais impactantes hoje neste domínio é a exploração antrópica, principalmente pela intensificação de atividade agrícola (ROSOLEN *et al.*, 2015). Mais da metade da vegetação original do Cerrado já perdeu espaços para plantios de culturas como soja, algodão e cana-de-açúcar (MMA/IBAMA, 2012).

A ocupação do Cerrado proporciona profundas alterações ambientais, pois este domínio tem como principal característica possuir solos não muito férteis para agricultura (RADA, 2013), o que intensifica o uso de tecnologias para atingir a alta produtividade, como a utilização de defensivos agrícolas como herbicidas, inseticidas e fungicidas com intuito de eliminar pragas e plantas daninhas, descaracterizando e destruindo a vegetação nativa (SOARES e PORTO, 2007). Estima-se que apenas 20% desta vegetação nativa estejam intactas (MMA/IBAMA, 2012).

Na região centro-oeste do Brasil, há uma vasta utilização de herbicidas nas culturas de soja, milho, sorgo, cana-de-açúcar e pastagens, tanto em pré ou pós-emergência, entre o 2,4-D e o nicosulfuron. O herbicida 2,4-D é um mimetizador de auxina, que induz mudanças metabólicas e bioquímicas. Após absorção do 2,4-D, em baixas concentrações, verifica-se rápido aumento da atividade das enzimas celulase e

RNA-polimerase, enzimas envolvidas na biossíntese de proteínas. Aumento nesses processos leva a síntese de outros hormônios vegetais promovendo divisão e alongamento celular acelerado e desordenado, aumento da atividade enzimática, turgescência e rompimento das células (MACHADO *et al.*, 2006; OLIVEIRA JR, 2011).

O herbicida nicosulfuron, da família das sulfoniluréias, tem como mecanismo de ação a inibição da atividade da enzima acetolactato sintetase (ALS), que é responsável por catalisar a reação na produção dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. Após sua absorção é rapidamente translocado para a região de crescimento ativo das plantas, desencadeando aumento do catabolismo proteico, que por sua vez interfere na síntese de DNA, inibindo seu desenvolvimento. Em plantas suscetíveis, ocorre a paralisação do crescimento e desenvolvimento de clorose interneval e ou, arroxamento foliar. Normalmente, o meristema apical necrosa e morre antes das demais partes velhas da planta (OLIVEIRA JR, 2011).

Esses herbicidas são passíveis de atingir culturas vizinhas e a longas distâncias, em função da deriva, cuja intensidade é determinada principalmente pelas condições climáticas e tamanho das gotas (WANG e RAUTMAN, 2008). Portanto, a deriva assume grande importância considerando que os herbicidas são de amplo espectro de controle e com elevada toxicidade, especialmente para espécies sensíveis (LOCKE *et al.*, 1996; TUDURI *et al.*, 2006). A ocorrência de deriva provoca baixo controle das plantas daninhas, fato que concorre para o aumento compensatório de dosagem, resultando em maiores gastos e prejuízos para as espécies não alvo e ao meio ambiente (EGAN *et al.*, 2014).

Uma forma de conhecer o impacto desses poluentes no ambiente ocorre mediante utilização de espécies indicadoras de impacto ambiental, por meio do biomonitoramento. Esse método faz uso de reações da vida biológica, em qualquer nível, como forma de caracterizar mudanças nas condições ambientais (ARNDT e SCHWEIZER, 1991). Por definição, uma planta indicadora da presença de determinado poluente é aquela que tem qualquer nível de sensibilidade, no entanto, para fins de biomonitoramento, as mais adequadas são as medianamente sensíveis (NUNES e VIDAL, 2009). A exposição a agentes poluentes pode ser avaliada por medidas da concentração do agente químico em amostras ambientais, ou através da medida das características biológicas ou via monitorização biológica por meio de indicadores biológicos ou biomarcadores (AMORIN, 2003).

Um biomarcador pode ser uma alteração bioquímica, fisiológica ou morfológica como consequência do contato do organismo com um xenobiótico ou de seu efeito (MELANCON, 1995). Sensíveis ao agente estressor ajudam a identificar os mecanismos básicos da relação causal entre o estressor e seus efeitos (ADAMS, 2002). Ao utilizar um conjunto de biomarcadores, obtém-se visão mais ampla dos efeitos tóxicos de contaminantes no organismo estudado (VIARENGO *et al.*, 2007). Como biomarcadores podem ser citadas as análises fisiológicas como trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, conteúdo de pigmentos cloroplastídicos, permeabilidade de membranas, bioquímicas.

As vantagens da utilização do biomonitoramento no ambiente, de maneira geral, incluem além da sua simplicidade e versatilidade, a alta sensibilidade e a detecção de alterações metabólicas (VIARENGO *et al.*, 2007). Além da identificação do nível que uma determinada espécie pode suportar a presença de determinado contaminante (DOMINGOS *et al.*, 2004).

Considerando as mudanças na fisionomia do Cerrado ao longo da sua ocupação, a intensa antropização, e as características peculiares da vegetação, do clima e solo, pesquisas para identificação de espécies nativas fitoindicadoras assumem papel importante na análise dos impactos de poluentes, sobretudo herbicidas, sobre este ambiente. O Baru (*Dipteryx alata* Vogel) pertencente à família Fabaceae tem ocorrência em solos pobres do Cerrado, com grande potencial econômico, podendo ser utilizado para diversos fins: aproveitamento silvicultural, alimentício, forrageiro, oleaginoso, madeireiro e paisagístico, podendo, também, ser empregado em recuperação de áreas degradadas e plantio de enriquecimento de pastagens (MORENO *et al.*, 2007).

Neste contexto, no presente estudo, foi investigada a hipótese de que plantas nativas do Cerrado, como *D. alata*, têm sensibilidades diferenciais aos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron. Essa sensibilidade pode ser utilizada na definição do potencial fitoindicador da ação desses herbicidas em áreas nativas próximas às áreas agricultáveis, por meio da utilização de biomarcadores bioquímicos e fisiológicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **Science American Fish**, n.3, p. 104-112, 2002.

AMORIN, L. L. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação dos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 11, p. 1-13, 2003.

ARNDT, U.; SCHLESINGER, B. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: Biological monitoring – signals from the environment (Ellenberg, H. *et al.*, eds). **Viewg Eschbotin**, p. 199-259, 1991.

DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; BULBOVAS, P.; CUNHA, A.L.; LONGUI, E.L.; LOURENÇON, D.A.C.B.; MORAES, R.M.; RINALDI, M.C.S; MAZZONI-VIVEIROS, S.C. Reaction of *Caesalpinia echinata* Lam., a Brazilian tree species, to urban air pollution stress. In Urban air pollution, bioindication and environmental awareness (A. Klumpp, W. Ansel & G. Klumpp, eds.). **Cuvillier Verlag**, Göttingen, p. 279-287, 2004.

EGAN, J.F.; BOHNENBLUST, E.; GOSLEE, S.; MORTENSEN, D.; TOOKER, J. Herbicide drift can affect plant and arthropod communities. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.185, p. 77-87, 2014.

GROVES, E.M.; KENT FORSTER, R.K. A Corn (*Zea mays* L.) bioassay technique for measuring HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, n.125, p.189–198, 1968.

HEMPHILL JR. D. D.; MONTGOMERY, M. L. Response of vegetable crops to sublethal application of 2,4-D. **Weed Science**, v. 29, n. 6, p. 632-635, 1981.

HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers. In: HUGGET, R.J. et al. (Ed.). Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. **Boca Raton: Lewis Publishers**, p. 155-209, 1992.

LOCKE, M.A.; SMEDA, J.R.; HOWARD, K.D.; REDDY, K.N. Clomazone volatilization under varying environmental conditions. **Chemosphere**, v.33, n.7, p. 1213-1225, 1996.

MACHADO, R. F.; BARROS, A. C. S. A; ZIMMER, P. D.; AMARAL, A. S. Reflexos do mecanismo de ação de herbicidas na qualidade fisiológica de sementes e na atividade enzimática em plântulas de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, p.151-160, 2006.

MELANCON, M. J., Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, G. A., Cairns, J (Eds.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: LEWIS pg. 220-240, 1995.

MMA/IBAMA. Relatório de monitoramento do bioma Cerrado 2008-2009: Cooperação técnica para o monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite. Brasília, março 2011.

MORENO, M. A.; TARAZI, R.; DEFAVARI, G. R.; FERRAZ, E. M.; MORAES, M. L. T.; CANUTO D. S. O.; GANDARA, F. B.; CIAMPI, A. Y.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética de *Dipteryx alata* VOG. em uma população natural do Município de Campina Verde – MS. **Resumos do 53º Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia- SP, setembro, 2007.

NUNES, A. L.; VIDAL, R. A. Seleção de plantas quantificadoras de herbicidas residuais. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 19, p. 19-28. 2009.

OLIVEIRA JUNIOR, R. S. Mecanismo de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA JUNIOR, R. S. et al. (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**, p. 141-192, 2011.

OLIVEIRA, A.N. Variações genéticas entre e dentro de procedências de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Dissertação de Mestrado**. UFLA, Lavras, p. 81, 1998.

PALHARES, D.; FRANCO, A.C.; ZAIDAN, L.B.P. Respostas fotossintéticas de plantas de cerrado nas estações seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 2, p. 213-220, 2010.

RADA, N. Assessing Brazil's Cerrado agricultural miracle. **Food Policy**, v.38, p.146-155, 2013.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In Cerrado: ambiente e flora (EDS S.M. Sano & S.P. Almeida), PP, 87-166 **Embrapa-CPAC**, 1998.

RONQUIM, C.; PRADO, C.H. e PAULA, N.F. Growth and photosynthetic capacity in two woody species of Cerrado vegetation under different radiation availability. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.2, p.243-252, 2009.

ROSOLEN, V.; DE-CAMPOS, A.B.; GOVONE, J.S.; ROCHA, C. Contamination of wetland soils and floodplain sediments from agricultural activities in the Cerrado Biome (State of Minas Gerais, Brazil). **Catena**, v.128, p.203-210, 2015.

SOARES, W. L. e PORTO, M. F. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no Cerrado brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12 n.1, p.131-143, 2007.

TUDURI, L.; HARNER, T.; BLANCHARD, P.; LI, Y.; POISSANT, L.; WAITE, D.T.; MYRPHY, C.; BELZER, W. A review of currently used pesticides (CUPs) in Canadian air and precipitation. Part. 2: Regional information and perspectives. **Atmospheric Environment**, v.40, p. 1579-1589, 2006.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organism. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.146, n.3, p. 281-300, 2007.

WANG, M.; RAUTMAN, D. A simple probabilistic estimation of spray drift-factors determining spray drift and development of a model. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27, n.12, p.2617-2626, 2008.

## OBJETIVO

Objetivou-se neste estudo identificar biomarcadores fisiológicos e bioquímicos que permitam avaliar o potencial fitoindicador de plantas de *Dipteryx alata* Vogel do impacto dos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron.



## CAPÍTULO I

### FOTOSSÍNTESE COMO BIOMARCADOR DA AÇÃO DO 2,4-D E NICOSULFURON EM PLANTAS DE *Dipteryx alata*: UMA ESPÉCIE NATIVA DO CERRADO

(Normas de acordo com a revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*)

## RESUMO

Diversos fatores de estresse, incluindo herbicidas, provocam alterações nos processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares em plantas. A fotossíntese é um dos fatores mais sensíveis a alterações ambientais. Qualquer dano nos pigmentos fotossintéticos, complexos proteico da cadeia transportadora de elétrons, incluindo os fotossistemas e, as vias de redução de carbono, reduz a capacidade fotossintética. A compreensão deste indicador fisiológico e a sua resposta a contaminantes é importante na seleção de plantas fitoindicadoras da ação desses poluentes em vegetação nativa. Objetivou-se avaliar se as características fotossintéticas de plantas de *Dypteryx alata* podem ser utilizadas para a determinação do potencial desta espécie como fitoindicadora da contaminação ambiental pelos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron. Dois estudos independentes foram realizados para avaliar o efeito destes herbicidas nas trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, pigmentos cloroplastídicos e a permeabilidade de membranas de plantas de *D. alata*. No primeiro estudo, aplicou-se o 2,4-D nas doses: 0 (controle), 134, 268, 536, 1072, 1340, 1608 e 1876 g e.a ha<sup>-1</sup>. No segundo, utilizou-se o nicosulfuron nas doses: 0 (controle), 6, 12, 24, 48, 60, 72 e 84 g e.a. ha<sup>-1</sup>. As plantas foram avaliadas às 24, 96 e 396 horas após a aplicação do 2,4-D e 24, 96 e 576 horas após aplicação do nicosulfuron. Os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron promoveram alterações na maquinaria fotossintética das plantas de *D. alata*, poucas horas após a aplicação. O aumento da taxa respiratória, do *NPQ* e da concentração de carotenoides nas plantas tratadas com 2,4-D foram importantes na proteção contra o excesso de energia absorvida. Em adição, a ausência de sintomas foliares e de liberação de eletrólitos nas plantas expostas ao 2,4-D indica tolerância desta espécie ao herbicida. O

aumento da taxa de liberação eletrólitos nas plantas tratadas com nicosulfuron é indicativo de peroxidação lipídica, como evidenciando pelos sintomas foliares. Conclui-se que as alterações no metabolismo fotossintético das plantas de *D. alata* são indicadores fisiológicos úteis na classificação desta espécie como potencial fitoindicadora da ação do nicosulfuron e fitosensora do 2,4-D.

**Palavras-chave:** herbicida, fotoproteção, Cerrado, eficiência fotoquímica.

#### ABSTRACT

Many stress factors, including herbicides, cause changes in physiological, biochemical and molecular processes in plants. Photosynthesis is one of the most sensitive factors to environmental change. Any damages in the photosynthetic pigments, protein complexes of the electron transport chain, including the photosystems and carbon reduction pathways, reduce photosynthetic capacity. Understanding this physiological indicator and its response to contaminants is essential in selecting phytoindicator plants of the action of these pollutants in native vegetation. The objective was to assess whether the photosynthetic characteristics of *Dypteryx alata* plants can be used to determine the potential of this species as phytoindicator of environmental contamination by 2,4-D and nicosulfuron herbicides. Two independent studies were carried out to evaluate the effect of these herbicides in gas exchange, chlorophyll a fluorescence, chloroplast pigments and membranes permeability of *D. alata* plants. In the first study the 2,4-D was applied in the doses: 0 (control), 134, 268, 536, 1072, 1340, 1608 and 1876 g ha<sup>-1</sup>. In the second study nicosulfuron was used in the doses: 0 (control), 6, 12, 24, 48, 60, 72 and 84 g ha<sup>-1</sup>. Plants were evaluated at 24, 96 and 396 hours after application of 2,4-D and 24, 96 to 576 hours after application of nicosulfuron. The 2,4-D and nicosulfuron herbicides provided changes in the photosynthetic machinery of *D. alata* plants, few hours after application. The increased respiratory rate, *NPQ* and carotenoid concentration in plants treated with 2,4-D were important in protecting the plants against the excess of absorbed energy. In addition, no foliar symptoms as well as no electrolyte leakage in plants exposed to 2,4-D indicates tolerance of the species to this herbicide. The increased electrolyte leakage rate in plants treated with nicosulfuron indicates lipid peroxidation, as noticed by foliar symptoms. It is concluded that changes in photosynthetic metabolism of *D. alata* plants are useful physiological indicators to rank

this species as potential phytoindicator of nicosulfuron action and phytosensor of 2,4-D action.

Key words: herbicide, photoprotection, Cerrado, photochemical efficiency.

## 1. Introdução

O aumento na expansão do uso da terra para interesses humanos é considerada uma das principais causas da perda de biodiversidade em ecossistemas terrestres (DOMINGOS et al., 2015). Esta perda é devida tanto pela fragmentação dos ecossistemas quanto pela contaminação ambiental por diversos contaminantes (SAWIDIS et al., 2011; PÉREZ-VEJA et al., 2012).

Na região centro-oeste do Brasil, a intensa antropização do domínio Cerrado, desencadeou perdas de cerca de 50% da sua área original (MMA/IBAMA, 2012). Embora seja consenso que a degradação dessas áreas é consequência direta da expansão agrícola, acompanhada pelo aumento do uso de agrotóxicos, como herbicidas (MARRIS, 2005), são necessários protocolos metodológicos adequados para avaliar os efeitos potenciais desses contaminantes sobre a vegetação remanescente do Cerrado.

Métodos de biomonitoramento, que são baseados na medição de respostas selecionadas (aqui referidos como biomarcadores) são muito utilizados no Hemisfério Norte para investigação do impacto de pesticidas, os quais exploram respostas de plantas em diferentes fases fenológicas (CARPENTER e BOUTIN, 2010; BASSA et al., 2011; BOUTIN et al., 2014). Entre os biomarcadores possíveis de mensuração e utilização na identificação de plantas com potencial bioindicador se destacam lesões visíveis na folha (BENHAM et al., 2010), pigmentos cloroplastídicos (GUTIERREZ-RODRIGUES e LATASHA, 2011) e a fluorescência da clorofila *a* (DEWEZ et al., 2008 e KUMAR et al., 2014).

A utilização desses biomarcadores na avaliação do impacto ambiental pode ser ferramentas promissoras (ROSE et al., 2006), uma vez que poderá auxiliar na detecção dos níveis de contaminação (RATOLA *et al.*, 2014) e detecções precoces de possíveis alterações biológicas, principalmente de espécies nativas (MACHADO et al., 2013). No ambiente Cerrado, estes estudos ainda são incipientes e a utilização de espécies nativas pode contribuir em diagnósticos mais precisos da condição ambiental e dos riscos iminentes de contaminantes como herbicidas.

Dentre as diversas espécies nativas do Cerrado, encontra-se a *Dipteryx alata* Vogel, pertencente à família Fabaceae, de ocorrência nas diferentes fisionomias do Cerrado e plasticidade adaptativa em relação à outras espécies que são encontradas em apenas um bioma (ALMEIDA, 2008). É uma espécie de grande valor para o Cerrado e por isso é protegida por leis e órgãos ambientais do Brasil. A espécie integra a lista da flora ameaçada de extinção, principalmente pelo avanço do desmatamento para extração de madeira, expansão da soja e cana-de-açúcar, bem como na formação de pastagens (CARNEIRO *et al.*, 2014; RIBEIRO, 2011).

Entender a dinâmica da fotossíntese de *D. alata*, em condições estressantes é altamente desejável. Pouco se conhece sobre o efeito destes herbicidas no metabolismo fotossintético destas plantas e das estratégias para proteção do aparato fotossintético. A maquinaria fotossintética é facilmente perturbada por herbicidas (DARWISH *et al.*, 2015), com ocorrência de efeitos nocivos, que variam de alterações na difusão de CO<sub>2</sub> (OLESEN e CEDERGREEN, 2010), no transporte de elétrons, até mudanças na estrutura do aparelho fotossintético (WALTERS, 2005), com consequente diminuição na eficiência fotoquímica (DAYAN e ZACCARO, 2012). Essa sensibilidade pode ser utilizada como biomarcadora da ação do herbicida no monitoramento da resposta do indivíduo.

No presente estudo, foi investigada a hipótese de que plantas *Dipteryx alata* são sensíveis aos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron, e que essa sensibilidade pode ser monitorada por meio de avaliações do metabolismo fotossintético. Estas alterações podem ser boas indicadores fisiológicas, para a definição do papel desta espécie, como fitoindicadora da ação destes herbicidas em remanescentes de Cerrado. Nesse sentido, objetivou-se avaliar se as características fotossintéticas de plantas de *Dypteryx alata* podem ser utilizadas para a determinação do potencial desta espécie como fitoindicadora da contaminação ambiental pelos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron.

## 2. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde - GO, Brasil, em casa de vegetação climatizada do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, durante os meses de julho de 2013 e agosto de 2014.

## 2.1. Material vegetal e as condições experimentais

Sementes de *Dipteryx alata* Vogel foram semeadas em areia. Após 60 dias, 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 possuía as seguintes características: pH em H<sub>2</sub>O de 4,7; 2,6 mg/dm<sup>-3</sup> de P; 14 mg/dm<sup>-3</sup> de K; 0,75 cmolc/dm<sup>-3</sup> de Ca; 0,22 cmolc/dm<sup>-3</sup> de Mg; 3,1 cmolc/dm<sup>-3</sup> de H<sup>+</sup>Al; 13 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica e 24,4% de saturação por bases. O substrato foi adubado com 1,525 g por vaso de Ureia; 1,175 g por vaso de K<sub>2</sub>O; 6,9 g por vaso de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Além disso, foi adicionado 0,4 g por vaso de micronutrientes (Fritted Traced Elements<sup>®</sup>), São Paulo, Brasil) para suprir possíveis deficiências.

Plantas com 12 meses de idade foram padronizadas quanto ao tamanho e vigor e transferidas para casa de vegetação, 15 dias antes da imposição dos tratamentos, para aclimatização. Durante o período de avaliação as variáveis microclimáticas (temperatura e umidade relativa) da casa de vegetação foram monitoradas por meio de uma estação meteorológica (WATCH DOG - Weather Station, Spectrum Technologies, Inc, Aurora, Estados Unidos).

## 2.2 Imposição dos tratamentos

Foram conduzidos dois experimentos independentes. Sendo o primeiro para avaliação do efeito do herbicida 2,4-D (Nortox<sup>®</sup>, sal de dimetilamina de 2,4-diclorofenol ácido acético com 670 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido, Araçatuba/PR) nas doses: 0 (controle), 134, 268, 536, 1072, 1340, 1608 e 1876 g e.a. ha<sup>-1</sup>. E o segundo experimento, para avaliação do efeito do herbicida nicosulfuron (Sanson 40 SC, com 40 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido) nas doses: 0 (controle), 6, 12, 24, 48, 60, 72 e 84 g e.a. ha<sup>-1</sup>). As aplicações foram realizadas utilizando pulverizador costal (Herbicat<sup>®</sup> Catanduva, Brasil) com pressão constante mantida por CO<sub>2</sub> 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<sup>-2</sup>, proporcionando o volume de calda de 180 L ha<sup>-1</sup>.

## 2.3. Avaliações Fisiológicas

As avaliações foram realizadas no segundo par de folhas totalmente expandidas, entre as 08h00min e 10h30min, para as características de trocas gasosas e fluorescência

da clorofila *a*. A avaliação das taxas respiratórias foi realizada no período de 3h30min e 05h30min. As avaliações ocorreram nos seguintes tempos: para o herbicida 2,4-D (2, 24, 48, 60, 96, 120, 168, 264, 360 e 396 horas após a aplicação) e, para o herbicida nicosulfuron (2, 24, 48, 60, 72, 96, 120, 168, 144, 288, 384, 480 e 576 horas após aplicação). Esses tempos foram escolhidos para avaliar possíveis alterações iniciais, que poderão ser específicas da ação dos contaminantes. A avaliação do conteúdo de pigmento cloroplastídicos e permeabilidade de membranas foram realizadas por meio de coletas de discos foliares apenas na última hora de avaliação para cada herbicida.

### 2.3.1. Medições das trocas gasosas

As trocas gasosas das plantas 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 ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), da relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) e da taxa respiratória ( $\text{CO}_2$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Essas avaliações foram realizadas utilizando analisador automático de fotossíntese modelo LI-6400XTR (Licor®, Nebraska, Estados Unidos).

### 2.3.2. Medições de fluorescência de clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando 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), (BILGER *et al.*, 1995; LAISK e LORETO, 1996) e o coeficiente de extinção não fotoquímica ( $NPQ$ ) foi calculado segundo Bilger e Bjorkman (1990).

### 2.3.3. Conteúdo de pigmentos cloroplastídicos e permeabilidade de membranas

O conteúdo de pigmentos cloroplastídicos foi determinado por meio da extração com dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com  $\text{CaCO}_3$ , mediante ajustes da metodologia descrita por Kuki *et al.*, (2005). Três discos foliares com 5 mm de diâmetro foram incubados em DMSO em tubos âmbar e envolvidos com papel alumínio pelo período de

24 horas, sob temperatura de 65°C. Posteriormente a absorvância do extrato foi determinada utilizando o espectrofotômetro (Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA). Os comprimentos de ondas e as equações para o cálculo das concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenoides foram baseados no trabalho de Wellburn (1997).

A permeabilidade de membranas foi avaliada pela liberação de eletrólitos (TLE) de 15 discos foliares imersos em 30 mL de água destilada em tubos de ensaio, segundo a metodologia descrita por Vasquez-Tello *et al.*, (1990) e Pimentel *et al.*, (2002).

#### 2.4. Análise de sintomas visuais

As plantas foram fotografadas, utilizando uma Máquina Digital Finepix modelo SL 300, Zoom óptico 30x, 14 megapixels, LCD de alta resolução às 396 horas após aplicação do 2,4-D e às 576 horas após aplicação do nicosulfuron, a fim de verificar mudanças visuais provocadas pelos efeitos dos herbicidas.

#### 2.5. Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial 8 (doses) x 3 (tempos de avaliação), com cinco repetições, totalizando 120 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

A temperatura variou entre 21 a 29°C, enquanto a umidade relativa entre 52 e 71%. As baixas variações indicam que durante o período experimental não ocorreu sobreposição do estresse nas plantas avaliadas, sendo assim, os resultados obtidos são decorrentes dos tratamentos.



### 3.2 Trocas gasosas

As variáveis de trocas gasosas indicam que houve mudança na taxa fotossintética ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), taxa transpiratória ( $E$ ) e na concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) [Figura 1 A-H], ao longo do tempo de exposição às doses dos herbicidas. Estas características foram modificadas a partir de 24 horas após aplicação.

Em particular, às 396 horas após aplicação (HAA), as plantas tratadas com o herbicida 2,4-D reduziram a  $A$  em 44%, a  $g_s$  em 52%, e a  $E$  em 44%, enquanto a  $C_i/C_a$  aumentou em 24% (Figura 1 A – D). Já para o herbicida nicosulfuron as reduções foram mais proeminentes às 576 horas, sendo de 88% na  $A$ , 70% na  $g_s$ , 45% na  $E$ , e ao contrário, aumento de 47% na  $C_i/C_a$  (Figura 1 E-H).

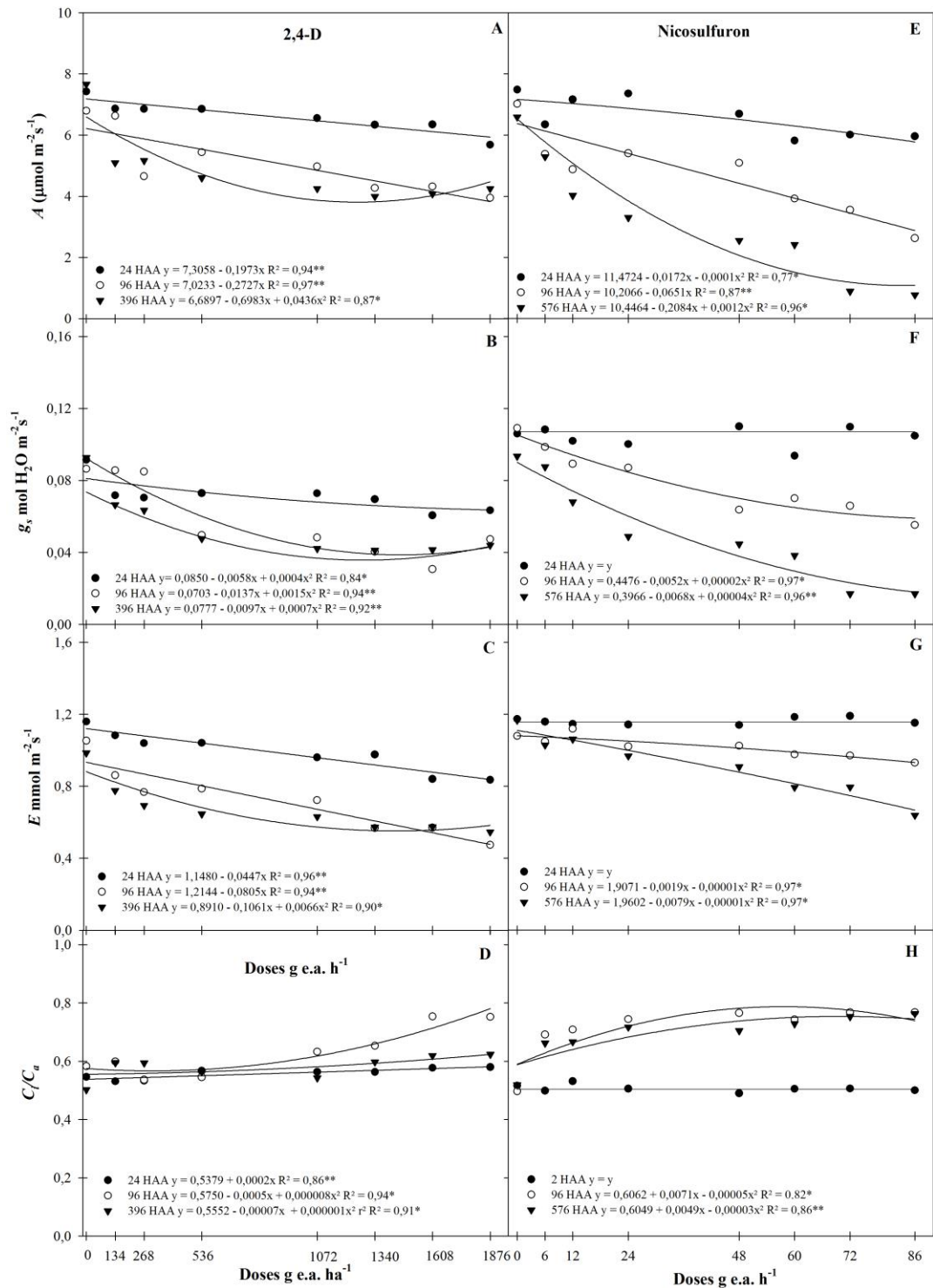


Figura 1. Taxa fotossintética [A] (A e E), condutância estomática ( $g_s$ ) (B e F), taxa transpiratória ( $E$ ) (C e G) e relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) (D e H) de *Dipteryx alata* Vogel tratadas com doses crescentes de 2,4-D (A-D) e nicosulfuron (E-H) e avaliadas em três diferentes tempos. Os dados são médias de  $n=5$ .

A taxa respiratória aumentou 79% em função das doses do 2,4-D (Fig. 2 A), principalmente às 396 (HAA). Já para o nicosulfuron foi observado reduções de 60% às 576 (HAA) (Fig. 2 B).

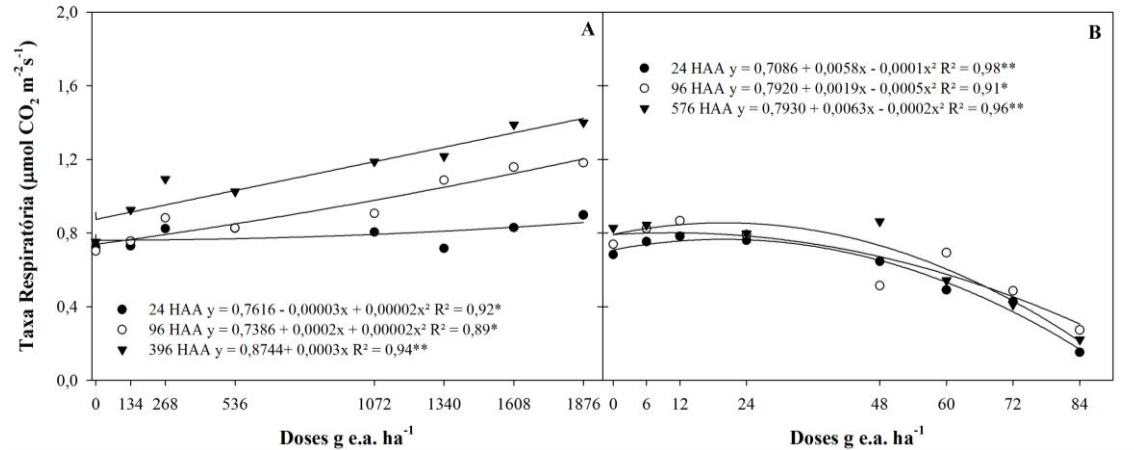


Figura 2. Taxa respiratória de *Dipteryx alata* Vogel tratadas com doses crescentes de 2,4-D (A) e nicosulfuron (B) e avaliadas em três diferentes tempos. Os dados são médias de  $n=5$ .

### 3.3. Fluorescência da clorofila *a*

Nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, observou-se alterações semelhantes àquelas ocorridas nas trocas gasosas. As doses do herbicida 2,4-D e nicosulfuron resultaram em alterações no rendimento quântico efetivo do fotossistema II ( $\Delta F/F_m'$ ), taxa aparente de transporte de elétrons (*ETR*) e no coeficiente de extinção não fotoquímica (*NPQ*) na *D. alata*. No entanto, nenhum dos herbicidas promoveu reduções pronunciadas nos valores da  $F_v/F_m$ , mesmo em função do tempo após a aplicação (Fig 3A e E).

Ambos os herbicidas, em todos os tempos avaliados, promoveram diminuição nos valores do  $\Delta F/F_m'$  e da *ETR* (Fig. 3C e G). Além disso, ambos os herbicidas promoveram aumento nos mecanismos de dissipação não fotoquímicos (*NPQ*) (Fig. 3 D e H). No entanto, valores mais pronunciados foram observados nas plantas tratadas com o 2,4-D (Fig. 3 D).

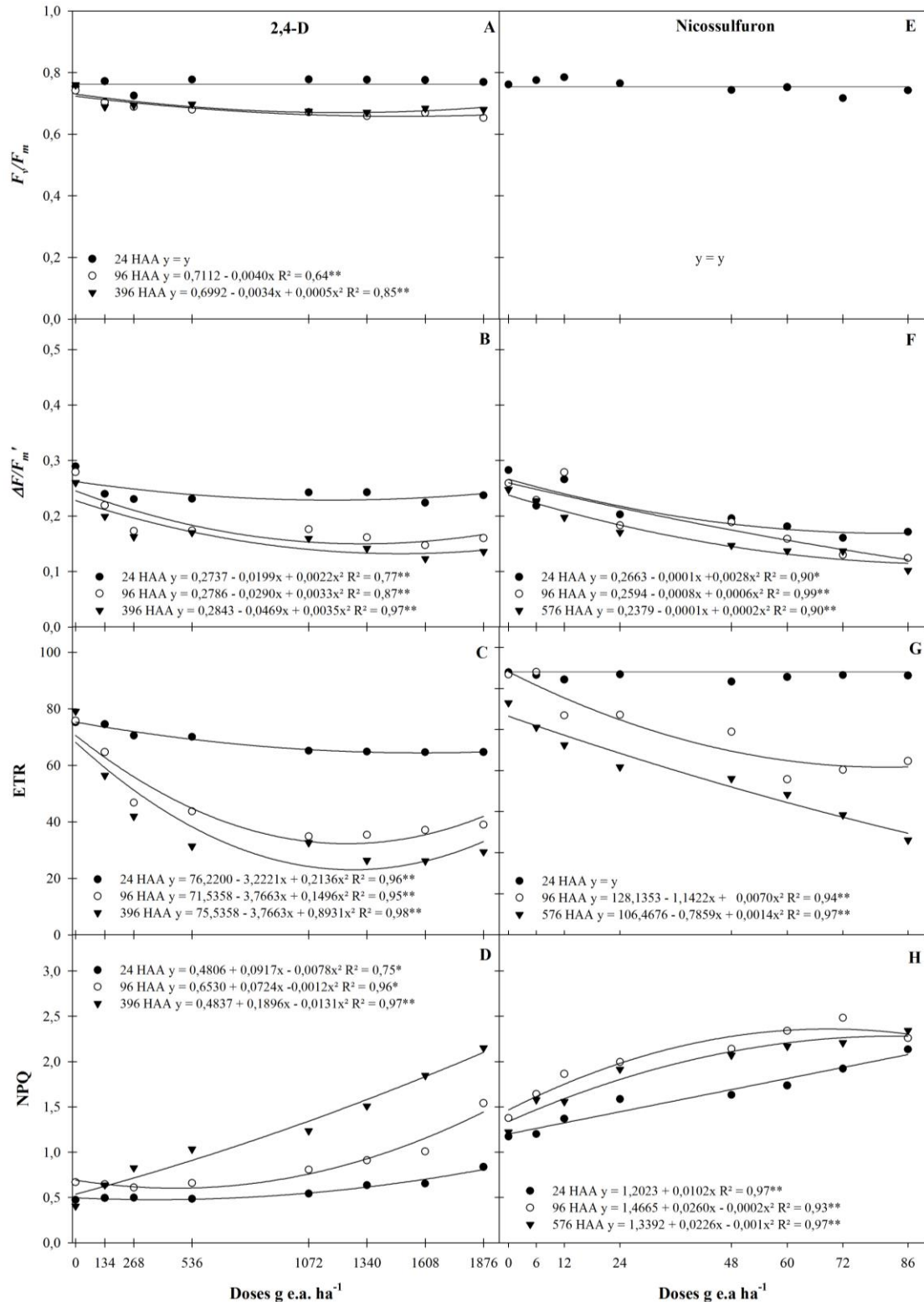


Figura 3. Rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ) (A e E), e rendimento quântico efetivo do FSII ( $\Delta F/F_m'$ ) (B e F), taxa de transporte de elétrons (ETR) (C e G) e *quenching* não fotoquímico (NPQ) (D e H) de *Dipteryx alata* Vogel, tratadas com doses crescentes de 2,4-D (A, B, C e D) e nicosulfuron (E, F, G e H) e avaliadas em três diferentes tempos. Os dados são médias de  $n=5$ .

### 3.4. Concentração de pigmentos cloroplastídicos e taxa de liberação de eletrólitos

A concentração de pigmentos cloroplastídicos também foi afetada pelos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron. A clorofila *a* e *b* reduziram cerca de 24% e 65% em função do aumento da dose do 2,4-D (Fig. 4 A) e efeitos mais pronunciados foram observados nas plantas expostas ao nicosulfuron com reduções de 59% e 75% respectivamente (Fig.4 B). O conteúdo de carotenoides variou em função da dose e do tipo de herbicida. Foi observado aumento de 258% no conteúdo de carotenoides em função do aumento da dose do 2,4-D (Fig. 4 C). Já para o nicosulfuron ocorreu decréscimos de 60% em função do aumento da dose do herbicida (Fig. 4 D).

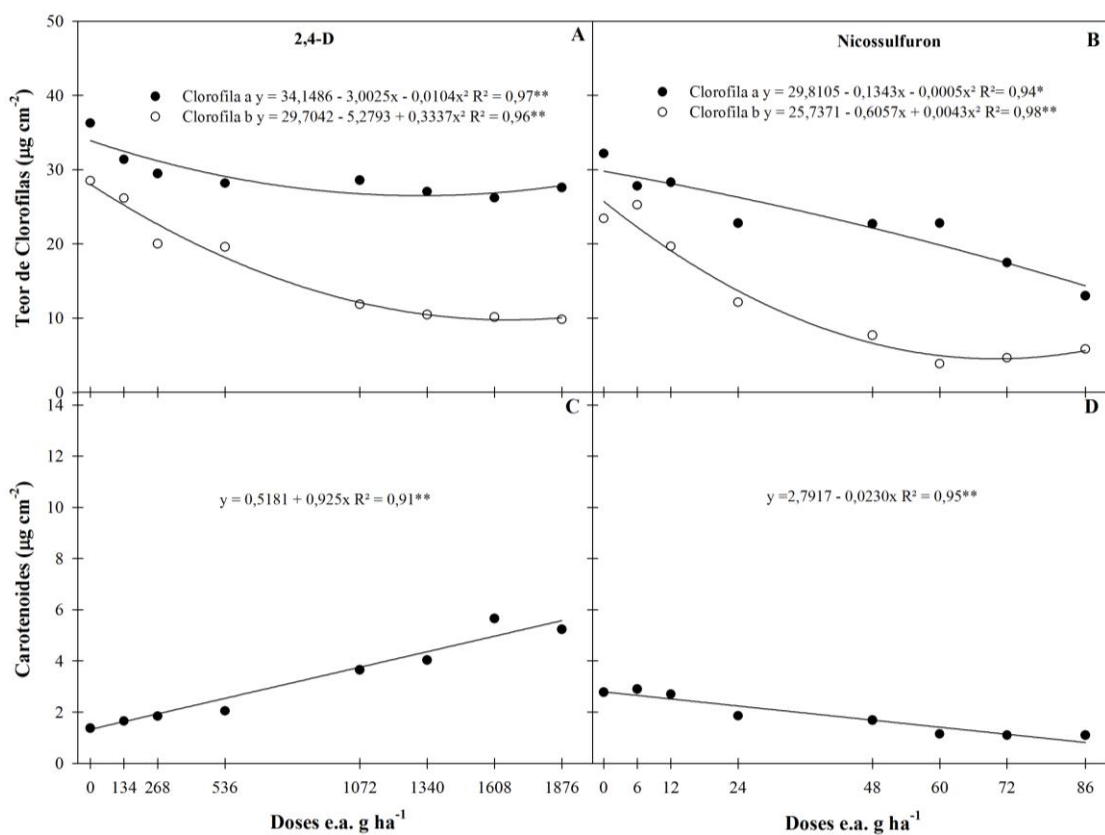


Figura 4. Teor de Clorofilas (A e B) e Carotenoides (C e D) de *Dipteryx alata* Vogel, tratadas com doses crescentes dos herbicidas 2,4-D (A e C) e avaliadas às 396 (HAA), e com doses crescentes de Nicosulfuron (B e D) e avaliadas às 576 (HAA). Os dados são médias de  $n=5$ .

O herbicida nicosulfuron promoveu danos nas membranas celulares, evidenciado pelo pronunciado aumento da taxa de liberação de eletrólitos (Fig. 5 A), o que não foi observado nas plantas tratadas com 2,4-D (Fig. 5 B).

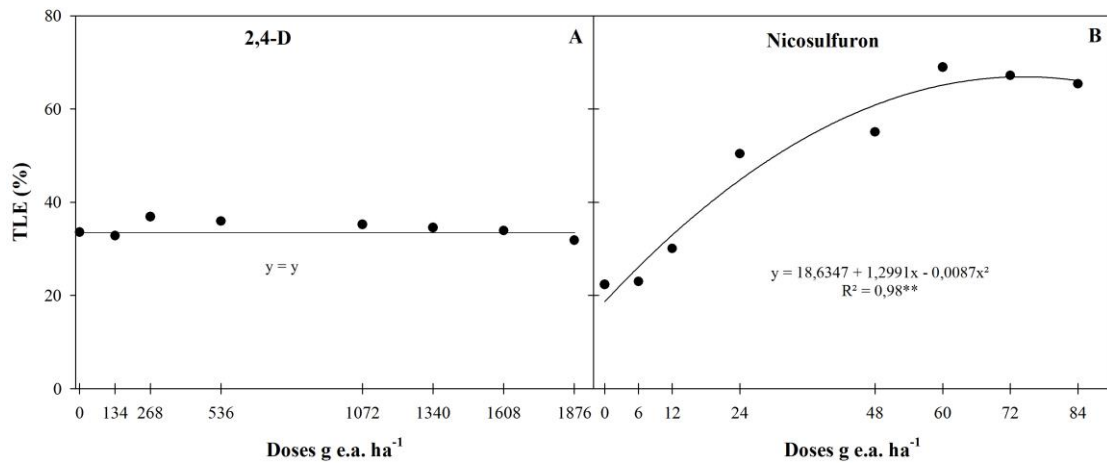


Figura 5. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE %) de *Dipteryx alata* Vogel, tratadas com doses crescentes dos herbicidas 2,4-D (A) e avaliadas às 396 (HAA), e com doses crescentes de nicosulfuron (B) e avaliadas às 576 (HAA). Os dados são médias de  $n=40$ .

### 3.5. Sintomas visuais de plantas *Dipteryx alata*

Não foram observados sintomas de toxicidade em plantas tratadas com 2,4-D (Fig. 6). No entanto, nas plantas tratadas com nicosulfuron esses sintomas foram evidentes (Fig. 7). Nessas plantas foram observados amarelecimento, pontuações cloróticas e necroses, sobretudo em doses superiores a 24 g e.a. ha<sup>-1</sup>. Os sintomas foram mais pronunciados nas regiões marginais e ápices foliares, com expansão para a nervura central.

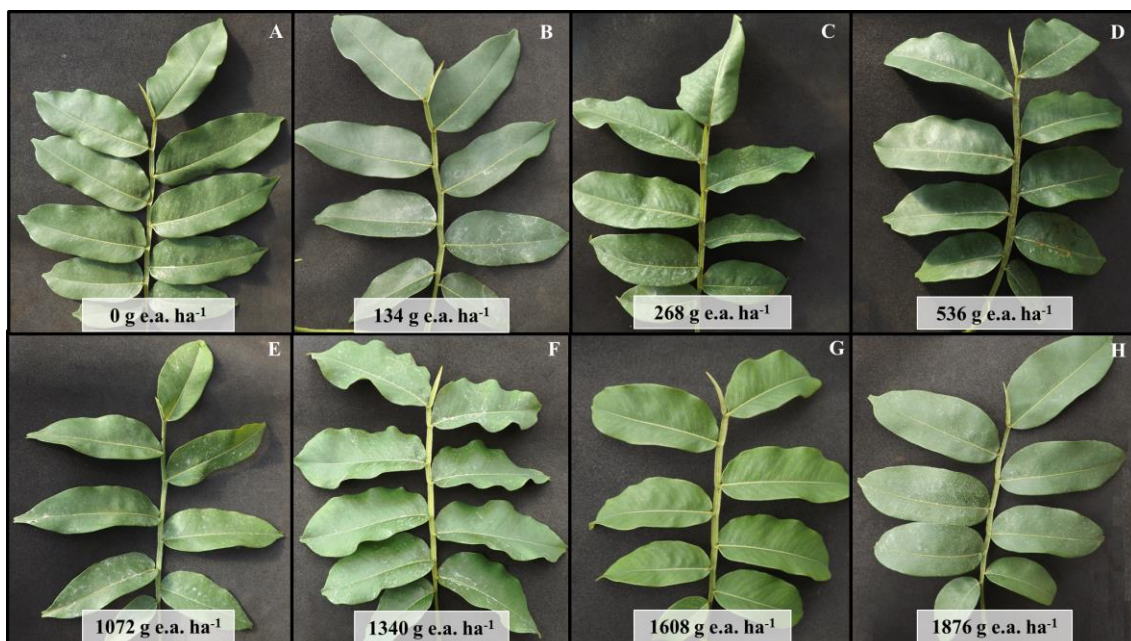


Figura 6. Ausência de sintomas visuais das folhas jovens de *Dipteryx alata* tratadas com doses crescentes de 2,4-D e avaliadas às 396 (HAA).

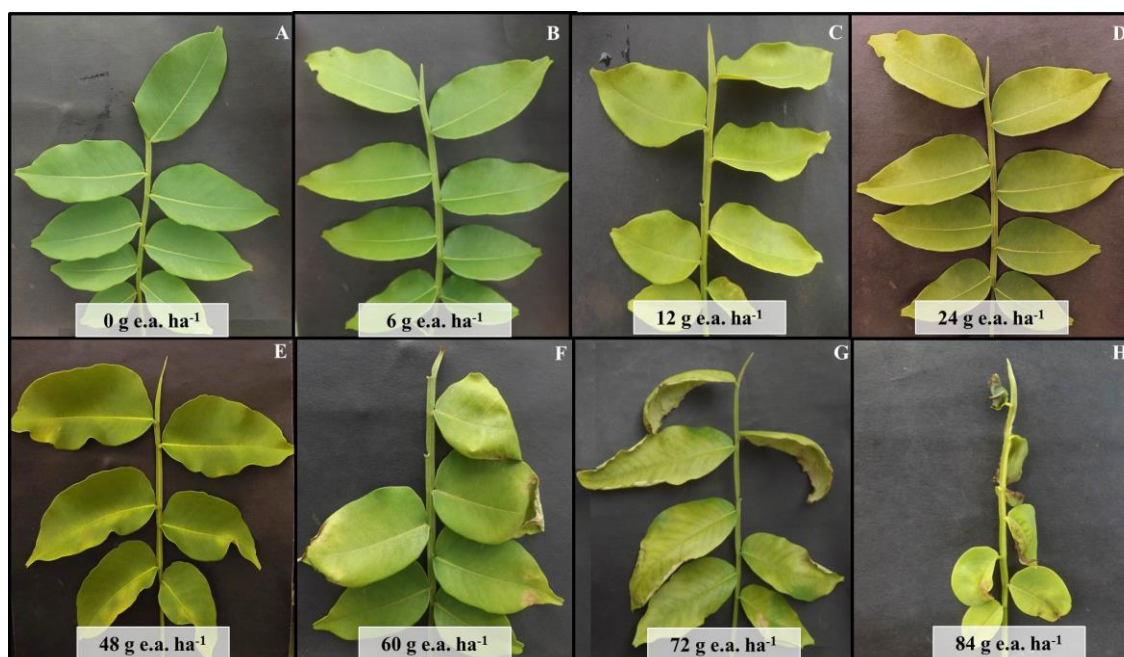


Figura 7. Sintomas visuais das folhas jovens de *Dipteryx alata* tratadas com doses crescentes de nicosulfuron e avaliadas às 576 (HAA).

#### 4. Discussão

De modo geral, os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron promoveram alterações no metabolismo fotossintético das plantas de *D. alata*. Os efeitos observados foram tanto estomáticos, mediante indução do fechamento dos estômatos, quanto não estomáticos mediante alterações na capacidade de fixação de carbono no Ciclo de Calvin. Embora os processos fotossintéticos não sejam alvos principais do 2,4-D e nicosulfuron, estudos apontam declínios na fixação de carbono em plantas sensíveis (ZABALZA et al., 2011 e PAZMIÑO et al., 2012).

A redução na  $g_s$  é um dos principais fatores limitantes à fotossíntese em plantas tratadas com o 2,4-D (PAZMIÑO et al., 2012). Neste estudo, o 2,4-D promoveu alterações difusionais, como demonstrado pela redução na  $g_s$ , sobretudo nas primeiras horas após a aplicação do herbicida. Esse herbicida altera uma variedade de processos fisiológicos, dentre eles, o estímulo da síntese do etileno por meio do aumento da expressão do gene que codifica o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). O ACC promove a ativação de canais iônicos envolvidos na resposta de alongamento

celular e, subsequente ativação da síntese de ácido abscísico mediado pela 9-*cis*-dioxigenase *epoxycarotenoide*, ocasionando o fechamento dos estômatos (GROSSMAN, 2010; PAZMIÑO et al., 2012). Mesmo com as diminuições observadas na  $A$ ,  $g_s$  e  $E$ , estes resultados não indicam danos ao processo de fixação de carbono, visto que a relação  $C_i/C_a$  diminuiu às 396 (HAA). A redução nos valores de  $C_i/C_a$  sugere que as plantas estão consumindo  $\text{CO}_2$  e a redução na fotossíntese está ocorrendo em função da baixa concentração do substrato por causa do fechamento estomático e, não por danos ao aparato fotossintético. Corroborando com essas observações, o fato de 2,4-D não ter promovido efeitos deletérios no fotossistema II, como observado pelos valores da razão  $F_v/F_m$ .

Também nas plantas expostas ao nicosulfuron as alterações nas trocas gasosas demonstram que o metabolismo de carbono foi afetado, evidenciado pela redução na  $A$ ,  $g_s$ ,  $E$  e aumento na relação  $C_i/C_a$ . Estômatos fechados e maior concentração de  $\text{CO}_2$  na câmara subestomática são indicadores da diminuição da eficiência carboxilativa. A eficiência carboxilativa pode ser afetada tanto pelo fornecimento de energia, na forma de ATP e NADPH ao Ciclo de Calvin, quanto por inibição de enzimas do próprio ciclo. Alterações na produção de ATP e NADPH também promovem alterações na formação do  $\Delta p\text{H}$  através das membranas dos tilacoides, que conjectura na diminuição no rendimento quântico do FSII (DAUD et al., 2015), conforme observado neste estudo mediante os baixos valores da  $\Delta F/F_m'$ . Mediante a análise das características da fluorescência da clorofila *a*, neste estudo, observa-se que a dissipação fotoquímica foi diminuída com conseqüente alteração da taxa fotossintética. Além das limitações do fornecimento de energia ao Ciclo de Calvin, a atividade do ciclo pode também ser afetada por efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio e de enzimas específicas do ciclo. AHSAN et al., (2008) reportam, por exemplo, que em plantas tratadas com glifosato, a rubisco pode ser inibida pela ação de EROs induzidas pelo herbicida.

Além dos efeitos na capacidade fotossintética, a respiração mitocondrial parece ter um papel fundamental na resposta de plantas de *D. alata* a estes herbicidas. O aumento da taxa respiratória, como observado neste estudo, promovido pelo herbicida 2,4-D, parece estar associado a maior atividade metabólica para desintoxicação celular. Sob condições de estresse, o fornecimento de hidratos de carbonos pode ser reduzido, e substratos alternativos, como proteínas e lipídeos, são utilizados no processo respiratório (ENGVIST et al., 2011; HÖRTENSTEINER e KRÄUTLER, 2011) e contribui na maior geração de energia para manutenção do metabolismo celular



(JACOBY et al., 2012), síntese de compostos de defesa e reparo de danos celulares (HOLLEY et al., 2010).

Ao contrário do que foi observado nas plantas tratadas com 2,4-D, a redução da taxa respiratória em plantas tratadas com o nicosulfuron possivelmente está relacionada à diminuição da disponibilidade de substratos fornecidos pelos processos fotossintéticos. A respiração utiliza compostos carbonatos derivados principalmente de fontes como trioses-fosfato, sacarose e amido (WANG e VANLERBERGHE, 2013). Reduções na produção desses compostos induz alterações na via glicolítica, no ciclo do ácido cítrico e conseqüentemente na cadeia transportadora de elétrons, impactando o estado redox da célula (HAUBEN et al., 2009). Além disso, após a inibição da enzima ALS, intermediários utilizados na produção dos aminoácidos de cadeia ramificada também são inibidos, como o  $\alpha$ -cetobutirato e o ácido cetoisovelérico. O ácido cetoisovelérico é precursor da Coenzima A (CoA), que é necessária para a síntese de acetil-CoA utilizados na biosíntese de proteínas, ácidos graxos e lipídeos, compostos importantes que constituem as membranas celulares (BROSNAN e BROSNAN, 2006). Embora não seja claro quais mecanismos estão envolvidos nos efeitos do nicosulfuron sobre a diminuição da atividade respiratória, é possível que a limitação de carboidratos do metabolismo fotossintético, associado à limitação na biossíntese do acetil-CoA, tenham sido os processos determinantes nas respostas observadas nas plantas de *D. alata*. A redução na taxa respiratória em adição aos efeitos secundários do nicosulfuron contribuíram para morte lenta da planta, como evidenciado pelo aumento da TLE e pela presença de sintomas visuais nas folhas de *D. alata*.

Além disso, as modificações nas características fotossintéticas resultaram em mudanças na fluorescência da clorofila *a*. Esses parâmetros fisiológicos são adequados para utilização como marcadores de lesões frente a diversos contaminantes (DAYAN e ZACARRO, 2012; QUIA et al., 2013). Sob condições normais a razão  $F_v/F_m$  possui valores ótimos em torno de 0,75 a 0,83 para a maioria das espécies (MAXWELL e JOHNSON, 2000; BAKER, 2008). Neste estudo, não foram observados reduções pronunciadas na  $F_v/F_m$  por efeito aos herbicidas, sugerindo que nem o 2,4-D ou o Nicosulfuron promoveram danos no fotossistema II. Corrobora esta constatação o aumento pronunciado na dissipação não fotoquímica, sobretudo na forma de calor, evidenciada pelos altos valores de  $NPQ$ , como importante mecanismo de fotoproteção, evitando que o excesso de energia seja convertido em estresse fotooxidativo com conseqüente degradação da proteína D1 do fotossistema II (CARBONERA et al., 2012).

Mesmo assim, tanto o 2,4-D quanto o nicosulfuron ocasionaram diminuições no rendimento quântico efetivo do FSII ( $\Delta F/F_m'$ ) e na taxa de transporte de elétrons (*ETR*). Em consequência, nestas plantas podem ocorrer a inibição progressiva do ciclo de Calvin em função da menor disponibilidade de ATP e NADPH, evidenciada pelo aumento da  $C_i/C_a$ , como observado nas plantas tratadas com nicosulfuron.

No entanto, entre os parâmetros de fluorescência, o aumento no *quenching* não fotoquímico foi rápido e sensível em resposta aos efeitos do 2,4-D e nicosulfuron. Nas plantas tratadas com o 2,4-D, especialmente as 396 (HAA), o aumento do NPQ pode estar relacionado com a regulação da distribuição de energia de excitação entre os fotossistemas, evitando possíveis danos no FSII (RUBAN e MURCHIE, 2012). Por ser reconhecido como um sensor do estado da maquinaria fotossintética (GOSS e LEPETIT, 2015), essa característica de fotoproteção pode impedir, ou diminuir, o acúmulo do excesso de energia de excitação, não utilizada nos processos de assimilação de carbono, mediante a via não fotoquímica (PELLEGRINI et al., 2014). Contudo, quando a dissipação do excesso de energia é insuficiente, um aumento na tensão fotooxidativa pode resultar na formação de EROS, sobrecarregando processos de desintoxicação (CHAGAS et al., 2008). Como consequência, diversos problemas podem ocorrer, como danos ao fotossistema II, inibição de enzimas de diversas rotas, ou ainda, a degradação de pigmentos do complexo coletor de luz, com posterior formação de cloroses e necroses (GOSS e LEPETIT, 2015), como evidenciado nas plantas tratadas com o nicosulfuron.

Corroborando com os dados de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, tanto o 2,4-D, quanto o nicosulfuron, reduziram a concentração de clorofila *a* e *b*. A degradação de pigmentos cloroplastídicos diminui a eficiência do complexo antena, com conseqüente diminuição na captação e transferência de energia para os fotossistemas (OLIVEIRA et al., 2009), observado neste estudo pela redução na *ETR*. O 2,4-D tem como alvo inicial os cloroplastos. Quando em excesso nesta organela, induz a produção EROs degradando os pigmentos (PAZMIÑO et al., 2012). No entanto, o aumento da concentração de carotenoides nas plantas expostas ao 2,4-D, associa-se ao aumento na dissipação térmica do excesso de energia, conforme observado pelos valores de NPQ, que funcionam como mecanismo que previnem a formação de clorofila tripleto ( $Chl^3$ ) e outros radicais livres que são formados durante processos oxidativos e que são deletérios à maquinaria fotossintética (CARBONERA et al., 2012). Os carotenoides são considerados indicadores de estresse precoce (PELLEGRINI, 2014), e também

antioxidantes lipídico-solúveis, que desempenham múltiplas funções no metabolismo, incluindo a tolerância ao estresse oxidativo (DIMM et al., 2015). Neste estudo, o aumento pronunciado de *NPQ*, associado a maior concentração de carotenoides, à ausência de danos nos fotossistemas, à estabilidade das membranas celulares demonstrado pelos valores estáveis da TLE e, a ausência de sintomas visuais nas plantas tratadas com 2,4-D, sugerem que a dissipação não fotoquímica foi um importante fator na proteção das plantas contra o excesso de energia absorvida e a formação de EROs.

Em plantas tratadas com Nicosulfuron, o aumento nos valores de *NPQ* não foi tão expressivo quanto nas plantas tratadas com 2,4-D, provavelmente em função da degradação de carotenoides. Esta condição aumenta a possibilidade de ocorrência de estresse oxidativo em função da formação de EROs com consequente degradação de componentes de plastos, como pigmentos e lipídios de membranas (KIM et al., 1999). Esta condição promove intensa instabilidade no funcionamento das membranas celulares e como consequência, elevada liberação do conteúdo celular, observado neste estudo por meio dos valores da TLE, e o surgimento de sintomas visíveis como clorose e necrose.

Esses resultados confirmam que, mesmo em doses baixas, os herbicidas testados promovem alterações na maquinaria fotossintética de plantas de *D. alata*, presumindo que em condições naturais podem ocorrer danos em espécies nativas. À medida que os parâmetros avaliados demonstram alterações com o tempo de exposição aos contaminantes, eles podem fornecer informações sobre o desenvolvimento do estresse e da dimensão do risco ambiental.

Neste estudo, o nicosulfuron promoveu alterações em diferentes processos fisiológicos de plantas de *D. alata*, que resultaram em injúrias visíveis nos órgãos das plantas. Nas condições deste estudo, estas alterações possibilitam a utilização da espécie como fitoindicadora da ação deste herbicida. Por outro lado, em resposta ao 2,4-D, não foram observadas injúrias visíveis, embora tenham sido detectadas alterações metabólicas, potencializando a utilização da espécie como fitosensora do 2,4-D. De Termmerman et al., (2004) classificaram as plantas fitoindicadoras como aquelas que apresentam sintomas visíveis como necroses, cloroses e distúrbios fisiológicos. Já as fitosensoras como aquelas que reagem aos efeitos do contaminante com sintomas não visíveis, apresentando alterações celulares, fisiológicas e bioquímicas. Nesse contexto, esta espécie possui características para utilização como monitora da ação de herbicidas

como o 2,4-D e nicosulfuron, permitindo possivelmente avaliar a extensão da contaminação em seu ambiente natural.

A utilização de plantas nativas no biomonitoramento deve ser apoiada por conhecimentos prévios sobre as alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em respostas ao estresse, podendo ser gerados em ambientes controlados, como neste estudo, e também no ambiente natural de ocorrência do fator estressante. São incipientes os estudos com espécies nativas do Cerrado mediante exposição a herbicidas, aumentando assim a importância destes resultados para a orientação de agricultores, órgãos públicos e indústria de agroquímicos, melhorando assim a gestão e a utilização sustentável de produtos químicos.

## 5. Conclusões

1. Os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron promovem alterações na maquinaria fotossintética de plantas de *D. alata*, com reduções nas características de trocas gasosas e na eficiência fotoquímica;
2. Os efeitos observados foram estomáticos, mediante indução do fechamento dos estômatos, para o 2,4-D e o nicosulfuron, e não estomáticos, como alterações na capacidade de fixação de carbono no Ciclo de Calvin, apenas para o nicosulfuron;
3. Os herbicidas induziram respostas fotossintéticas distintas nas plantas de *D. alata*, com maior sensibilidade ao nicosulfuron, podendo ser utilizados como indicadores sensíveis a este herbicida;
4. Mecanismos de dissipação de calor possuem papel importante na dissipação do excesso de energia e fotoproteção nas plantas tratadas com 2,4-D;
5. Plantas de *D. alata* possuem potencial para serem utilizadas como fitoindicadora da ação do nicosulfuron e, como fitosensora da ação do 2,4-D em remanescentes de Cerrado.

## 6. Referências bibliográficas

Ahsana, N., Leea, D., Leea, K., Alama, I., Lee, S., Bahka, J.D., Leea, B., 2008. Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach, *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, pp. 1062-1070.

- Almeida, S.P., Costa, T.S.A., Silva, J.A., 2008. Frutas nativas do Cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; Almeida, S. P.; Ribeiro, J. F. Cerrado: ecologia e flora. Brasília-DF: Embrapa Cerrados, 1279.
- Baker, N.R., 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. Annual Review Plant Biology, 59, pp. 89-113.
- Bassa, M., Boutin, C., Chamorro, L., Sans, F.X., 2011. Effects of farming management and landscape heterogeneity on plant species composition of Mediterranean field boundaries. Agriculture, Ecosystems and Environmental, 141, pp.455–460.
- Bilger, W., Schreiber, U., Bock, M., 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. Oecologia, 102, p. 425-432.
- Boutin, C., Strandberg, D., Carpenter, D., Mathiassen, S.K., Thomas, P.J., 2014. Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications?. Environmental Pollution, 185, pp.295-306.
- Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., 2006. Branched-Chain Amino Acids: Enzyme and Substrate Regulation. Journal The Journal of Nutrition, pp.207-211.
- Carbonera, D., Gerotto, C., Posocco, B., Giacometti, G.M., Morosinotto, T., 2012. NPQ activation reduces chlorophyll triplet state formation in the moss *Phycomitrella patens*. Biochimica et Biophysica Acta, 1817, pp.1608-1615.
- Carneiro, V.A., Gomes, H.B., Nasser, M.D., Resende, H.G. 2014. O Baru (*Dipteryx alata* Vog.) como exemplo de incremento de renda e de sustentabilidade de comunidades rurais no cerrado goiano: um relato de experiência via seminários da disciplina “Sistemas Agrários de Produção e Desenvolvimento Sustentável”. Revista InterAtividade, 2(2), pp.42-52.
- Carpenter, D., Boutin, C., 2010. Sublethal effects of the herbicide glufosinate ammonium on crops and wild plants: short-term effects compared to vegetative recovery and plant reproduction. Ecotoxicology 19, pp. 1322-1336.
- Chagas, R.M., Silveira, J.A.G., Ribeiro, R.V., Vitorrelo, V.A., Carrer, H., 2008. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposure to paraquat-induced oxidative stress. Pesticide Biochemistry and Physiology 80, pp.181-188.
- Darwish, M., Vidal, V., Lopez-Lauri, F., Alnaser, O., Junglee, S., Maataoui, M., Sallanon, H., 2015. Tolerance to clomazone herbicide is linked to the state of LHC, PQ-pool and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Journal of Plant Physiology, 175, pp. 122-130.
- Daud, M.K., Quiling, H., Lei, M., Ali, B., Zhu, S.J., 2015. Ultrastructural, metabolic and proteomic changes in leaves of upland cotton in response to cadmium stress. Chemosphere, 120, pp. 309-320.

- Dayan, F.E., Zaccaro, M.L.M., 2012. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102, pp. 189-197.
- Domingos, M., Bulbovas, P., Camargo, C.Z.S., Aguiar-Silva, C., Brandão, S.E., Dafré-Martinelli, M., Dias, Ana Paula, L., Engela, M.R.G.S., Gagliano, J., Moura, B.B., Alves, E.S., Rinaldi, M.C.S., Gomes, E.P.C, Furlan, C.M., Figueiredo, A.M.G., 2015. Searching for native tree species and respective potential biomarkers for future assessment of pollution effects on the highly diverse Atlantic Forest in SE-Brazil. *Environmental Pollution*, 202, p. 85-95.
- Engqvist, M.K.M., Kuhn, A., Wienstroer, J., Weber, K., Janser, E.E.W., Jakobs, C., Weber, A.P.M., Maurino, V.G., 2011. Plant D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase participates in the catabolism of lysine especially during senescence. *Journal Biology Chemistry*, 286, 11382-11390.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990, pp.87-92.
- Goss, R., Lepetit, B., 2015. Biodiversity of *NPQ*. *Journal of Plant Physiology*, 172, pp.13-32.
- Grossman, K. 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, 66, pp. 113–120.
- Hauben, M., Haesendonckx, B., Standaert, E., Van Der Kelen, K., Azmi, A., Akpo, H., Van Breusegem, F., Guisez, Y., Bots, M., Lambert, B., Laga, B., And De Block, M., 2009. Energy use efficiency is characterized by an epigenetic component that can be directed through artificial selection to increase yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, pp. 20109–20114.
- Hörtensteiner, S., Kräutler, B., 2011. Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, pp. 977–988.
- Jacoby, R.P., Li, L., Huang, S., Lee, C.P., Millar, A.H., Taylor, N.L., 2012. Mitochondrial composition, function and stress response in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54:11, pp. 887-906.
- Kuki, K.N., Oliva, M.A., Gomes F.P., Costa, A.C., 2005. Avaliação da eficiência do dimetilsulfóxido na extração de pigmentos foliares de *Schinus terebenthifolius* e *Cocos nucifera*. In: X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino-Americano de Fisiologia Vegetal, Recife. Anais, SBFV.
- Laisk, A., Loreto, F., 1996. Determining photosynthetic parameters from leaf CO<sub>2</sub> exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology* 110, pp.903-91.
- Machado, R.B., Ramos Neto, M.B., Pereira, P., Caldas, E.F., Gonçalves, D.A., Santos, N.S., Tabor, K., Steininger, M., 2004. Estimativas de Perda da Área do Cerrado Brasileiro. Conservation International do Brasil, Brasília (<http://www.conservation.org.br/arquivos/RelatDesmatamCerrado.pdf> (accessed August 21, 2014)).

- Marris, E., 2005. The forgotten ecosystem. *Nature*, 437:7061, pp. 944–945.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51:345, pp. 659-668.
- MMA/IBAMA. Relatório de monitoramento do bioma Cerrado 2008-2009: Cooperação técnica para o monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite. Brasília, março 2012.
- Olesen, C.F.N., Cedergreen, N., 2010. Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence, *Pesticide Management Science*, 66, pp. 536-542.
- Oliveira Júnior, R.S., Constantin, J., Brandão Filho, J.U.T., Callegari, O., Pagliari, P.H., Cavalieri, S.D., Framesqui, V.P., Carreira, S.A.M., Roso, A.C., 2007. Efeito de subdoses de 2,4-D na produtividade de uva Itália e suscetibilidade da cultura em função de seu estágio de desenvolvimento. *Engenharia Agrícola*, 27, pp. 35-40.
- Pazmiño, D.M., Romero-Puertas, M.C., Sandalio, L.M., 2012. Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants. *Plant Signaling and Behaviour*, 7, pp. 1–3.
- Pellegrini, E., 2014. PSII photochemistry is the primary target of oxidative stress imposed by ozone in *Tilia Americana*. *Urban Forestry e Urban Greening*, 13, pp. 94-102.
- Perez-Vega, A., Mas, G.F., Ligmann-Zielinska, A., 2012. Comparing two approaches to land use/cover change modeling and their implications for the assessment of biodiversity loss in a deciduous tropical forest. *Environmental Modelling Software*, 29, p. 11-23.
- Pimentel, C., Sarr, B., Diouf, O., Abboud, A.C.S., Macauley, H.R., 2002. Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivados em campo. *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, 22, pp.07-14.
- Rascher, U., Liebig, M., Lüttge, U., 2000. Evaluation of instant light response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant Cell Environment*, 23, pp.1397-1405,
- Ratola, N., Homem, V., Silva, J.A., Araújo, R., Amigo, J.M., Santos, L., Alves, A., 2014. Biomonitoring of pesticide by pine needles – Chemical scoring, risk of exposure, levels and trends. *Science of the Total Environment*, 476, pp.115-124.
- Ribeiro, J.F. O cerrado em pé como técnica para o estabelecimento de uso sustentável e conservação para o bioma Cerrado. Disponível em: <[http://www.cerradobrasil.cpac.embrapa.br/imagens/forumestadualma/arquivospdf/cerradoe\\_mpe.pdf](http://www.cerradobrasil.cpac.embrapa.br/imagens/forumestadualma/arquivospdf/cerradoe_mpe.pdf)>. Acesso em: 01 jun. de 2011.
- Rose, W.L., Nisbet, R.M., Green, P.G., Norris, S., Fan, T., Smith, E.H., Cherr, G.N., Anderson, S.L., 2006. Using an integrated approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topmelt. *Aquatic Toxicology* 80, 298–308.
- Ruban, A.V., Johnson, M.P., Duffy, C.D.P., 2012. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817, pp. 167–181.

Sawidis, T., Breuste, J., Mitrovic, M., Pavlovic, P., Tsigaridas, K., 2011. Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities. *Environmental Pollution*, 159, p. 3560-3570.

Vanlerberghe, C., Wang, J., 2013. A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress. *Plant Physiology*, 2013.

Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham T.A.T.J., Silva, V., 1990. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *Journal of Experimental Botany*, 41, pp.827-32.

Walters, R.G., 2005. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 56, pp.435–447.

Zabalza, A., Orcaray, L., Igal, M., Schauer, N., Fernie, Ar., Geigenberger, P., 2011. Unraveling the role of fermentation in the mode of action of acetolactate synthase inhibitors by metabolic profiling. *Journal Plant Physiology*, 168, pp.1568–75.



## CAPÍTULO II

### **BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS DA AÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E NICOSULFURON EM PLANTAS DE *Dipteryx alata*: UMA ESPÉCIE NATIVA DO CERRADO**

(Normas de acordo com a revista Environmental Monitoring and Assessment)

## RESUMO

Ao longo das últimas décadas, a vegetação do Cerrado no Brasil foi intensamente impactada pela expansão da atividade agrícola e pecuária, particularmente pela utilização de herbicidas em grande escala. Objetivou-se neste estudo avaliar alterações bioquímicas em plantas de *Dipteryx alata* tratadas com os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron e definir biomarcadores específicos que permitam caracterizar o potencial fitoindicador dessa espécie. Dois estudos independentes foram realizados para avaliar o efeito desses herbicidas na atividade de enzimas de defesa contra espécies reativas de oxigênio, seus danos celulares e, ainda, na atividade das enzimas aceto lactato sintase e da celulase. Ambos os herbicidas promoveram alterações na atividade das enzimas do sistema antioxidante, danos nas membranas celulares, mas com maior magnitude para nicosulfuron. A atividade das enzimas catalase e ascorbato peroxidase, assim como a concentração de malondialdeído e a taxa de liberação de eletrólitos, aumentaram em resposta ao herbicida nicosulfuron, indicando o potencial destas características como biomarcadoras desse herbicida. A inibição da aceto lactato sintase e aumento da atividade da celulase, em plantas tratadas com nicosulfuron e 2,4-D, respectivamente, também podem ser utilizadas como biomarcadores da ação desses herbicidas. Tomados em conjunto, os biomarcadores observados nas plantas de *D. alata*, em resposta ao nicosulfuron e ao 2,4-D, constituem características importantes na classificação da mesma como potencial fitoindicadora da ação do nicosulfuron e fitosensora da ação do 2,4-D, em remanescentes do cerrado localizados próximo a áreas de cultivo agrícola.

Palavras-chaves: agricultura, membranas, estresse oxidativo, celulase, ALS.

## ABSTRACT

Over the past decades, the Cerrado vegetation in Brazil was heavily impacted by the agriculture and livestock expansion, particularly by the use of large-scale herbicides. The objective of this study was to evaluate biochemical changes in plants *Dipteryx alata* plants treated with 2,4-D and nicosulfuron herbicides and set specific biomarkers that allow characterize the phytoindicator potential of this species. Two independent studies were carried out to evaluate the effect of these herbicides in the activity of defense enzymes against reactive oxygen species, their cellular damage and the Acetolactate Synthase and Cellulase enzymes activity. Both herbicides promoted changes in the enzymes activity of the antioxidant system, damage of cell membranes, but with higher magnitude to nicosulfuron. The activity of catalase and ascorbate peroxidase enzymes as well as malonaldehyde concentration, and electrolyte leakage rate increased in response to nicosulfuron, indicating the potential of these features as biomarkers of this herbicide. Inhibition of ALS in plants treated with nicosulfuron and increased cellulase activity in the plants treated with 2,4-D may also be used as biomarkers of the action of these herbicides. Together, the set of biomarkers found in plants of *D. alata*, in response to nicosulfuron and 2,4-D, are important characteristics in classifying it as a potential phytoindicator of nicosulfuron action and phytosensor of 2,4-D action, in remnants of Cerrado located near agriculture areas.

Key words: agriculture, membranes, oxidative stress, cellulase, ALS.

## **Introdução**

O Cerrado ocupa 24% do território brasileiro, e está entre os mais ricos em biodiversidade tropical do mundo (Borges et al. 2014). Nas últimas décadas, no entanto, a expansão da atividade agrícola e da pecuária, tem acarretado intensa degradação desse bioma, resultando em decréscimo de mais de 50 % da área original (IBGE 2012), em função, dentre outros fatores, pelo intenso uso de pesticidas (Batista, 2009; Costa e Pires 2010; Miranda et al. 2014). Entre as várias classes de pesticidas, os herbicidas utilizados nas áreas de cultivo exercem efeito deletério na vegetação natural circundante (Schiesari et al. 2013), especialmente pelo processo de deriva (Van Vliet et al. 2012) e poucos estudos tem dimensionado estes impactos.

No centro-oeste do Brasil, os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron são bastante utilizados por possuírem amplo espectro de controle e baixo custo (Dias et al. 2012; Cavalieri et al. 2012; Costa et al. 2014). Embora seus efeitos tóxicos sobre as plantas sejam bastante reportados, ainda são incipientes estudos sobre os efeitos que esses herbicidas acarretam em plantas do Cerrado. As moléculas desses herbicidas podem

alcançar a vegetação circundante de áreas agricultáveis por diversas vias como pela deriva, lixiviação, escoamento superficial, volatilização e erosão/carreamento (Nunes 2012).

Portanto, gerar conhecimentos que auxiliem no entendimento das reações do Cerrado aos herbicidas é de singular importância na definição de estratégias de mitigação, proteção e conservação desse bioma. Dentre os programas modernos de monitoramento ambiental, o uso de plantas como fitoindicadoras têm se destacado como ferramenta eficaz na avaliação da saúde do ambiente (Cajaraville et al. 2000; Raftopoulou e Dimitriadis 2010; Ospar 2012). Nesse cenário, a identificação e caracterização de plantas capazes de sobreviver, mas ao mesmo tempo indicar a presença de determinado contaminante, é crucial para o sucesso de programas de monitoramento do impacto ambiental.

Para que uma planta seja considerada fitoindicadora da presença de determinado poluente é necessário que essa possua sensibilidade suficiente para fornecer informações sobre o potencial impacto do agente estressor (Nunes e Vidal 2009). Plantas de tomate e rabanete, por exemplo, são excelentes fitoindicadoras do efeito residual do herbicida atrazina no solo (Marchesan et al., 2009). Já plantas de *Nicotiana tabacum* L., comumente usada em biomonitoramento da poluição atmosférica (Silva et al. 2012), têm sido utilizadas com sucesso no monitoramento de atrazina (Darwish et al. 2015) e metais pesados (Lugon-Moulin et al. 2006) por causa da maior sensibilidade e toxicidade em concentrações baixas desses contaminantes.

Assim como as avaliações morfofisiológicas e biomassa são utilizadas na identificação de plantas com potencial bioindicador de efeitos da poluição ambiental (Griboff et al. 2014), as respostas bioquímicas a esses distúrbios têm sido bastante reportadas como biomarcadores (Vidal-Liñán e Bellas 2013). Além destas características serem ferramentas úteis para o desenvolvimento de protocolos mais precisos para a detecção precoce da toxicidade de poluentes (Caregnato et al., 2010). As células vegetais possuem sistema integrado de defesa (Qiu et al., 2014), que é coordenado mediante cascatas de sinalização que culminam na transcrição de genes responsivos ao agente estressor. Dentre os sistemas de defesa, destacam-se os enzimáticos, como a ativação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), as quais são amplamente utilizadas como biomarcadores de estresse oxidativo, uma vez que a indução dessas reflete respostas diretas e indiretas a vários contaminantes (Van Der Oost et al. 2003; Lu et al. 2010; Vidal-Liñán e Bellas 2013). Além de ajudar na identificação de mecanismos de *feedback* entre o sistema de defesa antioxidante e as EROS na regulação do estresse oxidativo de plantas, desempenhando papel crucial na desintoxicação por contaminantes (Gill e Tutela 2010; Bernard 2014). No entanto, o sucesso da aplicação e abordagem dos biomarcadores depende de sua sensibilidade e especificidade frente ao contaminante (Adams, 2002).

Dewez et al., (2005), por exemplo, observaram que na alga *Scenedesmus obliquus*, baixas concentrações do fungicida fluoxonilo, induziram forte atividade das enzimas CAT, APX e GST, potencializando sua utilização como biomarcadoras sensíveis ao estresse oxidativo induzido pelo fungicida. Tsangaris et al. (2011), também,

reportaram a eficiência da utilização de biomarcadores bioquímicos, como a atividade das enzimas catalase e glutathione-S-transferase (GST), que foram sensíveis a compostos organoclorados. Também o conteúdo de malondialdeído (MDA) tem sido utilizado como um bom biomarcador de danos a membranas frente a contaminantes (Damiens et al. 2007; Xing et al. 2012; Griboff et al. 2014).

Dentre as espécies nativas do Cerrado, com possível potencial para fitoindicação de efeitos tóxicos de herbicidas, destaca-se o Baru (*Dipteryx alata* Vogel). A espécie possui ampla distribuição no bioma, pouca incidência de doenças e pragas (Ribeiro et al. 2000), baixa exigência de adubação e bom crescimento (Heringer 1978), além de ter potencial para utilização na recuperação de áreas degradadas (Vera e Souza 2009). A resistência da espécie a estresses bióticos e abióticos é fator importante no estudo da relação causal com sintomas morfofisiológicos, permitindo separar efeitos promovidos especificamente por contaminantes. Estas características potencializam a sua utilização como fitoindicadora do efeito tóxico dos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron em áreas de remanescentes do Cerrado. Neste estudo, foi avaliada a hipótese de que os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron promovem alterações bioquímicas sensíveis e específicas em plantas de *Dipteryx alata*, sendo bons biomarcadores da ação destes herbicidas. Portanto, objetivou-se neste estudo avaliar e caracterizar possíveis alterações bioquímicas em *D. alata* tratadas com os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron e, assim, definir biomarcadores que permitam caracterizar o potencial fitoindicador da espécie.

## Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação climatizada do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, durante os meses de junho (utilizando o herbicida 2,4-D) e novembro de 2014 (utilizando o herbicida nicosulfuron).

### Material vegetal e condições experimentais

Sementes de *Dipteryx alata* Vogel foram semeadas em areia. Após 60 dias, 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 H<sub>2</sub>O de 4,7; 2,6 mg/dm<sup>-3</sup> de P; 14 mg/dm<sup>-3</sup> de K; 0,75 cmolc/dm<sup>-3</sup> de Ca; 0,22 cmolc/dm<sup>-3</sup> de Mg; 3,1 cmolc/dm<sup>-3</sup> de H<sup>+</sup>Al; 13 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica e 24,4% de saturação por bases. O substrato foi adubado com 1,52 g por vaso de Ureia; 1,175 g por vaso de K<sub>2</sub>O; 6,9 g por vaso de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Além disso, foram adicionados 0,4 g de micronutrientes por vaso (Fritted Traced Elements<sup>®</sup> - São Paulo, Brasil) para suprir possíveis deficiências. Foram selecionadas plantas com 12 meses de idade, padronizadas quanto ao tamanho e vigor e transferidas para casa de vegetação 15 dias antes da imposição dos tratamentos para aclimatização.

## Imposição dos tratamentos e coleta de amostras

Foram conduzidos experimentos independentes por herbicida, em delineamento de blocos ao acaso, com três doses do herbicida e cinco repetições. No primeiro experimento, aplicou-se o herbicida 2,4-D (Nortox<sup>®</sup>, sal de dimetilamina de 2,4-diclorofenol ácido acético com 670 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido, Arapongas/PR) nas doses: 0 (controle), 536 e 1340 g e.a ha<sup>-1</sup>. No segundo experimento, aplicou-se o herbicida Nicosulfuron (Sanson 40 SC, com 40 g L<sup>-1</sup> do equivalente ácido, Arapongas/PR) nas doses: 0 (controle), 6, 24 e 48 g e.a. ha<sup>-1</sup>). As aplicações foram realizadas utilizando o pulverizador costal (Herbicat<sup>®</sup> Catanduva, Brasil) com pressão constante mantida por CO<sub>2</sub> 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<sup>-2</sup>, proporcionando volume de calda de 180 L ha<sup>-1</sup>. Foram coletadas amostras foliares para as análises enzimáticas no segundo par de folhas totalmente expandidas, entre as 07h30min e 10h30min. As coletas foram realizadas as 24 e 96 horas após a aplicação do herbicida 2,4-D e as 24 e 216 horas após a aplicação do herbicida nicosulfuron. As amostras de folhas foram conservadas em nitrogênio líquido para posterior avaliação.

## Avaliação de enzimas

Para a determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT), da ascorbato peroxidase (APX) e da celulase (CEL), foram macerados 0,2 g de tecido foliar em almofariz com nitrogênio líquido contendo 2 mL do seguinte meio de homogeneização: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsufônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona 2% (PVP). O extrato enzimático foi centrifugado a 12000xg durante 15 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado como extrato bruto (Debona et al., 2012). Para determinar a atividade da aceto lactato sintase (ALS), 0,2 g de tecido foliar foi moído conforme descrito anteriormente. O pó fino foi homogeneizado em 2 mL de solução contendo tampão fosfato de potássio (pH 7,5) 50 mM, cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 5 mM, EDTA 5 mM, 10% (v/v) de glicerol, piruvato 5 mM, dinucleótido de flavina e adenina (FAD) 100 µM, pirofosfato de tiamina (TPP) 1 mM, PVP 2% e PMSF 1 mM. O homogenato foi centrifugado a 20.000xg durante 20 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para análise (Muhitch 1988).

A atividade da SOD foi determinada a partir da metodologia proposta por Del Longo et al. (1993), medindo a capacidade da enzima em reduzir fotoquimicamente o azul de nitrotetrazólio (NBT). A reação consistiu da adição de tampão fosfato de potássio (pH 7,8) 50 mM, metionina 13 mM, NBT 0,075 mM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 0,002 mM. A reação foi iniciada após a adição 50 µL do extrato enzimático em 1,95 mL da mistura da reação. A reação ocorreu a 25°C sob exposição de uma lâmpada de 15 W. Depois de 10 min de exposição à luz, a luz foi interrompida e a produção de formazana azul, resultado da fotoredução do NBT, foi determinada a 560 nm em espectrofotômetro (Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA) de

acordo com Giannopolitis e Ries (1977). As amostras controle foram mantidas no escuro durante 10 min e medida a absorvância a 560 nm. Os valores obtidos do branco das amostras foram subtraídos dos valores das amostras de cada uma das repetições de cada tratamento exposto à luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich 1971).

A atividade da CAT foi determinada pela velocidade da quebra de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 240 nm durante 3 min a 25°C (Havir e Mc Hale 1987), com algumas modificações. A reação foi iniciada após adição de 10  $\mu$ L do extrato bruto enzimático em 990  $\mu$ L do meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio (pH 7,0) 25 mM e  $H_2O_2$  2,5 mM. O coeficiente de extinção molar de 36  $M^{-1} cm^{-1}$  (Anderson et al. 1995) foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

Para atividade da APX foi utilizada a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981). A reação foi iniciada após a adição de 50  $\mu$ l do extrato enzimático bruto em 1,95 ml do meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio (pH 6,0) 50 mM,  $H_2O_2$  1 mM e ascorbato 0,8 mM. A atividade APX foi medida pela taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm durante 1 min a 25°C. O coeficiente de extinção molar de 2,8  $mM^{-1} cm^{-1}$  (Nakano e Asada 1981) foi utilizado para calcular a atividade da APX.

A atividade da CEL foi determinada segundo a metodologia descrita por Nascimento et al. (2011). A reação foi iniciada após adição de 100  $\mu$ L do extrato enzimático bruto em mistura de reação contendo tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e carboximetilcelulose 1,5% (m/v). A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 37°C durante 18 h e, em seguida, foi adicionado 250  $\mu$ l de DNS. A reação foi incubada novamente em banho-maria 100°C durante 7 min e depois resfriada a 25°C em banho de gelo. A absorvância do produto liberado pela CEL foi medida a 540 nm. A quantidade de açúcares redutores liberados foi calculada mediante curva padrão de glicose (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (Miller 1959). Para as amostras controle, procedimento similar foi seguido, com excessão da primeira incubação.

A metodologia proposta pelo Muhitch (1988), com algumas modificações, foi usada para determinar a atividade da enzima ALS. A reação foi iniciada após a adição de 200  $\mu$ l do extrato bruto enzimático ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio (pH 7,5) 50 mM, piruvato de sódio 40 mM,  $MgCl_2$  10 mM, TPP 0,62 mM e FAD 34  $\mu$ M. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C durante 1 h. Em seguida, 0,2 ml de 30% (v/v) de ácido sulfúrico foi adicionado para parar a reação e converter a acetolactato a acetoína. As amostras foram centrifugadas a 1.700xg durante 10 min. O acetolactato foi quantificado indiretamente conforme segue: 1 ml da solução contendo creatina 0,5% (v/v) e  $\alpha$ -naftol 1,0% (v/v) dissolvidos em NaOH 4 N foram adicionados aos sobrenadantes e os tubos incubados a temperatura ambiente. Após 1 h, mediu-se a absorvância a 520 nm (Westerfeld 1945). O branco das amostras foi acidificado antes da adição da enzima, e a atividade do branco das amostras subtraída de cada amostra. O coeficiente de extinção molar de 15000  $M^{-1} cm^{-1}$  (Forlani et al., 1991) foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

A atividade das enzimas foi expressa com base em proteína, cuja concentração foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976).

## Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Para determinação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, amostras de 0,2 g foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2,0 mL meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) e hidroxilamina 1mM, seguida da centrifugação a 10.000xg por 15 min a 4 °C (Kuo e Kao 2003). A reação foi iniciada após adição de 150 µL do sobrenadante ao meio de reação contendo sulfato de amônio de ferro (FeNH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) 100mM, ácido sulfúrico 25mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e, após se mediu a absorbância a 560nm. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi estimada com base em curva de calibração preparada com padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Brancos, para os reagentes e os extratos vegetais, foram preparados em paralelo e subtraídos das amostras.

## Conteúdo de malondialdeído (MDA) e taxa de liberação de eletrólitos

Amostras de 0,15 g de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v), seguido de filtração através de quatro camadas de gazes e da centrifugação a 10.000xg por 15 min a 4°C. Para a reação, Alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v) em TCA 20% (m/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho-maria a 95°C por 30 min. A reação foi paralisada em banho de gelo por 1 min e centrifugado a 9.000xg por 4 min a 25°C. A absorvância foi medida a 600 e 440 nm. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi obtida mediante subtração das absorvâncias e da utilização do coeficiente de absorvância molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Hodges 1999), sendo os resultados expressos em nmol g<sup>-1</sup> de massa fresca.

A permeabilidade de membranas foi avaliada pela taxa de liberação de eletrólitos (TLE) de 15 discos de folhas imersos em 30 mL de água desionizada em tubos de ensaio, segundo a metodologia descrita por Vasquez-Tello et al. (1990) e Pimentel et al. (2002).

## Análise de sintomas visuais

As plantas foram fotografadas, utilizando uma Máquina Digital Finepix modelo SL 300, Zoom óptico 30x, 14 megapixels, LCD de alta resolução nas 96 horas após aplicação do 2,4-D e nas 216 horas após aplicação do nicosulfuron.

## Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias Tukey. 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* Sigma Plot V.10 (SPSS Inc., USA).



## Resultados

### Atividades de enzimas antioxidantes

Os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron promoveram alterações na atividade das enzimas do sistema antioxidante. A atividade da SOD aumentou em função das doses do 2,4-D (Fig. 1-A), independente do tempo de avaliação. Já nas plantas expostas ao nicosulfuron (Fig. 1-B) ocorreu aumento expressivo da atividade da SOD, às 24 HAA, em função das doses aplicadas. Porém, a taxa de aumento não se manteve às 216 HAA, observando-se, inclusive, valores semelhantes ao controle na maior dose aplicada. A atividade das enzimas CAT e APX aumentou em função das doses de 2,4-D, sobretudo às 24 HAA (Fig. 1 C-E). Para o nicosulfuron o aumento da atividade das enzimas CAT e APX ocorreu em função das concentrações e das horas após aplicação, porém de forma mais pronunciada às 216 HAA (Fig. D e F).

### Determinação de danos celulares

Houve aumento na concentração de  $H_2O_2$  em plantas submetidas ao 2,4-D, e de forma mais pronunciada às 24 HAA (Fig. 2 A). Para o nicosulfuron esse aumento ocorreu em função da dose e do tempo após a aplicação do herbicida, particularmente às 216 HAA na dose de 48 g e.a.  $ha^{-1}$ .

A integridade de membranas também foi afetada pelos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron. Para o 2,4-D não houve interação entre as doses do herbicida e os tempos após aplicação para a concentração de MDA. Observa-se aumento de 18% na concentração de MDA em função do incremento das doses do 2,4-D (Fig. 3 A), sobretudo no último tempo de avaliação (Fig. 3 B). Efeitos mais severos foram observados nas plantas expostas ao nicosulfuron, especialmente às 216 HAA.

Para a taxa de liberação de eletrólitos, não houve interação entre as doses dos herbicidas e nas horas após aplicação, para ambos herbicidas analisados, sendo esse efeito significativo apenas para as doses. Semelhante ao observado para MDA houve aumento na taxa de liberação de eletrólitos em plantas tratadas com o nicosulfuron (Fig. 5 A). No entanto, a alteração na concentração de MDA nas plantas tratadas com 2,4-D não culminou em aumento da TLE (Fig. 5 B).

### Atividade das enzimas Celulase e Aceto lactato sintase

A exposição das plantas ao herbicida 2,4-D acarretou aumento pronunciado na atividade da enzima celulase logo após a aplicação. Interessantemente, transcorridas às 96 HAA, a atividade da enzima se manteve alta, mas com valores bem menores em relação aos observados anteriormente (Fig. 6).

Em resposta ao nicosulfuron a atividade da enzima ALS foi reduzida em função do aumento das concentrações do herbicida (Fig. 7). Sendo esse efeito não significativo em função do tempo de aplicação do nicosulfuron.

### Sintomas visuais de *Dipteryx alata*

Não foram observados sintomas de fitotoxidez nas plantas submetidas ao 2,4-D (Fig. 8 A-C). Entretanto, as plantas expostas ao nicosulfuron apresentaram sintomas de amarelecimento, pontuações cloróticas e necróticas nos ápices e nos bordos foliares (Fig. 9 A-C). Esses sintomas de toxidez ocorreram principalmente nos ápices foliares e na nervura central.

## Discussão

De modo geral, os herbicidas 2,4-D e Nicosulfuron promoveram alterações no metabolismo das plantas de *D. alata* com toxicidade evidenciada pelo aumento da concentração de  $H_2O_2$ , danos nas membranas celulares, aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante e de enzimas específicas da rota do mecanismo de ação dos herbicidas. No entanto, efeitos mais deletérios ocorreram em resposta ao nicosulfuron e menos pronunciados em relação ao 2,4-D. Além da atuação dos herbicidas afetando rotas específicas, aparentemente, o sistema antioxidativo menos robusto foi determinante na sensibilidade das plantas tratadas com o nicosulfuron. Ao contrário, a maior atividade das enzimas do sistema antioxidante nas plantas tratadas com 2,4-D, sobretudo nas primeiras horas após a aplicação, contribuiu para o menor dano celular comparado ao promovido pelo nicosulfuron. Em adição, evidencia-se que o sistema de defesa antioxidante de *D. alata* possui especificidades em relação ao tipo de molécula do herbicida, sendo mais eficiente para o 2,4-D.

A tolerância da planta às EROs envolve mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, constituindo o sistema de defesa antioxidante (Scandalios 1993). Entre os mecanismos não enzimáticos se destacam antioxidantes como o ascorbato,  $\alpha$ -tocoferol, poliaminas, carotenoides e flavonoides (Maheshwari e Dubey 2009) e as glutations (Ratnam et al. 2006), não sendo estes objetos deste estudo. Já os enzimáticos constituem enzimas importantes na rota de detoxificação de EROS como a SOD, a CAT, a APX, a peroxidase da glutaciona (GPX) e a redutase da glutaciona (GR) (Noctor e Foyer 1998; Dixon et al. 2010). Contudo, foram analisadas as enzimas SOD, CAT e a APX, que atuam diretamente na remoção das EROS.

A maior atividade da SOD, neste estudo, possivelmente está relacionada ao mecanismo de defesa contra o aumento de superóxidos ( $O_2^-$ ) promovido pelos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron. No entanto, após a dismutação de  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  pela SOD, a detoxificação da célula depende ainda da ação complementar de enzimas como CAT e APX, as quais degradam o  $H_2O_2$ , uma vez que esse subproduto também é tóxico. Neste cenário, a maior atividade dessas enzimas, observada neste estudo, funcionam como parte do sistema integrado na degradação de EROs (Oruc et al. 2004; Machado et al. 2013; Chaabani et al. 2015). Adicionalmente, os resultados deste estudo evidenciaram que o sistema antioxidante de *D. alata* é eficiente em amenizar os danos causados pelo 2,4-D, pois mesmo com o incremento de  $H_2O_2$  não se observou fitotoxidez nas plantas o que, possivelmente, está relacionado ao aumento na atividade das enzimas CAT e APX.

A produção de EROs ocorre em consequência da toxicidade de vários xenobióticos, incluindo os herbicidas (Maran et al. 2009; Ozden et al. 2013; Lysenko et

al. 2014; Messina et al. 2014). Estudos demonstram que o 2,4-D induz a acumulação excessiva de EROS em diferentes espécies de plantas (Romero-Portas et al. 2004; Sunohara e Matsumoto 2008; Grossmann et al. 2011). Pazmiño et al. (2011), por exemplo, confirmaram a existência de superprodução de EROS em folhas de ervilhas jovens e maduras expostas ao 2,4-D, mediante análises do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que desencadeou processos de cloroses e necroses, que não foi observado neste estudo. O aumento da produção de EROS induzida pelo 2,4-D é uma consequência direta da ativação de enzimas específicas, tais como a acil-CoA oxidase (ACX) envolvida na β-oxidação de ácidos graxos, além da enzima celulase, que está envolvida na degradação de compostos de parede celular (Pazmiño et al. 2012).

O aumento na atividade da celulase é característico de herbicidas mimetizadores de auxina (Oliveira Jr et al. 2011). Essa enzima atua na degradação da celulose na parede celular, reduzindo a resistência física, promovendo o alongamento celular (Machado et al. 2006). Os sintomas visuais da ação da enzima celulase são caracterizados pela ocorrência de epinastia, retorcimento do caule, engrossamento das gemas terminais e destruição do sistema radicular (Dou et al. 2000; Sunohara e Matsumoto 2008), mas, não foram observados nas plantas de *D. alata*. Neste estudo, a ausência de sintomas possivelmente está associada à diminuição da taxa de aumento da atividade da enzima celulase às 96 (HAA). Caso a atividade da enzima se mantivesse tão pronunciada como observado às 24 (HAA), possivelmente, às lesões causadas pelo herbicida seriam irreversíveis. A diminuição da taxa de aumento da atividade da celulase nas plantas de *D. alata* pode estar relacionada aos mecanismos de desintoxicação do herbicida. Dentre os possíveis processos determinantes da tolerância de plantas ao 2,4-D, destaca-se o rápido metabolismo mediado pela enzima citocromo P450 monooxigenase (reações de hidroxilação e oxidação) convertendo a molécula do herbicida em ésteres de glicose que são menos tóxicos à planta (Schuler, 1996). Além disso, Sandermann (1992) relata que o 2,4-D pode ser conjugado pela enzima glutathione S-transferase (GST), e após ser compartimentalizado no vacúolo, promovendo a desintoxicação celular.

Embora tenha ocorrido maior atividade das enzimas SOD, CAT e APX nas plantas expostas ao nicosulfuron, este sistema de defesa não foi eficiente para evitar que as EROS, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, promovessem danos celulares com o consequente desenvolvimento de lesões cloróticas, que evoluíram para necroses. Neste estudo, a maior atividade das enzimas CAT e APX às 216 (HAA), indica que estas enzimas podem ser utilizadas como biomarcadoras da ação do nicosulfuron, pois foram rapidamente responsivas aos efeitos desse herbicida. Ao contrário desse resultado, Caregnato et al. (2010) analisando parâmetros de estresse oxidativo de quatro variedades de *Phaseolus vulgaris* expostas ao O<sub>3</sub>, foi observado aumento de cerca de 2,5 vezes da atividade da CAT em duas variedades quando expostas ao ozônio, no entanto esta resposta foi relacionada à proteção contra as EROS geradas pela exposição ao poluente, sugerindo que esta enzima desempenha papel importante na resistência à toxicidade ao O<sub>3</sub>, podendo ser utilizada como biomarcador precoce da toxicidade do poluente.

A redução da atividade da enzima ALS nas plantas de *D. alata*, tratadas com o nicosulfuron, está diretamente relacionada ao mecanismo de ação do herbicida, sendo observado em várias espécies de plantas sensíveis (Zulet et al. 2013; García-Garijo et al. 2014; Zulet et al. 2015). A ação de inibidores da ALS não está diretamente relacionada ao estresse oxidativo. No entanto, a inibição dessa enzima, envolvida na biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada (Ocaray et al. 2012), pode promover indiretamente a formação de EROS. Essa possibilidade é coerente com reduções no desempenho do metabolismo fotossintético, decorrente do acúmulo de carboidratos solúveis e aminoácidos livres e, conseqüentemente, pela superprodução de EROS (Zabalza et al. 2004; Gaston et al. 2003; Gaston et al. 2002; Zulet et al. 2015). Neste estudo, o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultante da inibição da ALS, atuou diretamente no processo de peroxidação lipídica e no rompimento de membranas, evidenciado pelo aumento da concentração de MDA e na TLE. Produzido durante a peroxidação de lipídeos, o MDA é um importante indicador do dano celular que resulta em aumento no extravasamento de eletrólitos (Dallagnol et al. 2011). Em concordância com nossos resultados, o elevado acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas de ervilhas submetidas ao tratamento com inibidor da ALS, também resultou em peroxidação de lipídeos, que se deu, pelo menos em parte, em um sistema antioxidativo menos robusto (Zabalza et al. 2007). Neste estudo, embora tenham sido observado aumento no conteúdo de MDA nas plantas expostas ao 2,4-D, esse aumento não foi suficiente para promover alterações na fluidez da membrana, o que pôde ser constatado pela estabilidade dos valores de TLE.

Tomados em conjunto, mediante análise dos resultados deste estudo, é possível propor que as variáveis estudadas podem ser utilizadas como biomarcadores da ação dos herbicidas 2,4-D e nicosulfuron. A maior atividade das enzimas CAT e APX, assim como o conteúdo de MDA e TLE foram eficientemente responsivos ao herbicida nicosulfuron, demonstrando especificidade ao herbicida. Em contrapartida, a alteração hormonal ocasionada pelo 2,4-D pode ter alterado a cascata de sinalização, levando uma resposta rápida ao estresse, como verificado pela eficiente ação do sistema de defesa antioxidante. Adicionalmente, a atividade da ALS, assim como a da Celulase também podem ser utilizadas como bons biomarcadores da ação do nicosulfuron e do 2,4-D, respectivamente, uma vez que estas enzimas são os alvos primários no mecanismo de ação destes herbicidas (Oliveira Jr et al. 2011). Ambas as enzimas possuem elevada especificidade e sensibilidade aos respectivos herbicidas, constituindo biomarcadores robustos da ação dos mesmos. Os sintomas visuais em decorrência da ação do nicosulfuron, associados às medidas metabólicas, podem contribuir de forma eficiente na análise dos impactos causados por este herbicida na vegetação nativa. A sensibilidade, especificidade e facilidade de detecção são características essenciais na seleção de biomarcadores precisos em resposta ao fator de estresse (Olson et al. 2009).

O conjunto de biomarcadores observados nas plantas de *D. alata*, em resposta, sobretudo ao nicosulfuron que resultou em danos visuais, associada à ampla ocorrência da espécie no Cerrado, constituem características importantes na classificação da mesma com potencial fitoindicadora da ação deste herbicida em remanescentes do cerrado localizados próximo a áreas de cultivo agrícola. Adicionalmente, as respostas bioquímicas das plantas ao 2,4-D e a ausência de sintomas visuais permitem classificar

a mesma como potencial fitosensora da ação do herbicida. Ressaltando que, embora alterações nas respostas oxidativas, observadas neste estudo, possam ocorrer em resposta a outros fatores de estresse, como o déficit hídrico e altas temperaturas, normalmente esses herbicidas são utilizados em épocas de cultivo agrícola em que estes fatores de estresse abiótico não prevalecem. Portanto, em contraste com as características peculiares de *D. alata*, cuja espécie apresenta tolerância aos estresses supracitados neste estudo, essas informações tomadas em conjunto, consolidam os resultados obtidos.

## Conclusões

1. Os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron promovem alterações no metabolismo das plantas de *D. alata*, com aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, danos nas membranas celulares e aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante;
2. Os herbicidas utilizados induzem respostas metabólicas distintas nas plantas de *D. alata*, com maior sensibilidade ao nicosulfuron;
3. As enzimas CAT e APX, a concentração de MDA e a TLE, possuem maior sensibilidade e especificidade ao nicosulfuron, podendo ser utilizadas como biomarcadores sensíveis ao herbicida;
4. A atividade das enzimas ALS e Celulase podem ser utilizadas como biomarcadores específicos e eficazes em resposta a ação do nicosulfuron e 2,4-D, respectivamente;
5. A atividade das enzimas do sistema antioxidante de defesa foi robusta na proteção das plantas contra o estresse oxidativo ocasionado pelo 2,4-D;
6. Em conjunto os biomarcadores observados nas plantas de *D. alata* potencializam a classificação como fitoindicadora da ação do nicosulfuron e fitosensora da ação do 2,4-D em remanescentes de vegetação nativa do cerrado.

## Referências

- Juárez, A.B., Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Vesentini, N., Conforti, V., Gualtieri, P. (2008). In vivo microspectroscopy monitoring of chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorina uniccocca* and *Chlorella kessleri*, *Journal of Environmental Monitoring*, 10, 1313-1318.
- Adams, S. M., (2002). Biological indicators of aquatic ecosystem stress. *Science American Fish*, 3, 104-112.
- Ahmed, A.E.R., Labavith, J.M, (1980). Cell-wall metabolism in ripening fruit. II. Changes in carbohydrate degrading enzymes in ripening Bartlett pears. *Plant Physiology* 65, 1014–1016.
- Anderson, D., Prasad, K., Stewart, R., (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109, 1247–57.

- Batista, A.P., Carvalho, S.M., Carvalho, G.A., Carvalho, C.F., Bueno Filho, J.S.S.M., 2009. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., (Hymenoptera: Apidae). Arquivos do Instituto Biológico, 76 (4), 597-606.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44, 276–87.
- Bernad, F., Brulle, F., Dumez, S., Lemiere, S., Platel, A., Nesslany, F., Cuny, D., Deram, A., Vandebulcke, F., 2014. Antioxidant responses of Annelids, Brassicaceae and Fabaceae to pollutants: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 23-31.
- Borges, L.A.B., Ramos, M.L.G., Vivaldi, L.J., Fernandes, P.M., Madari, B.E., Brenn, T.A.S, Fontura, P.R., 2014. Impacto f sugarcane cultivation on the biological attributes of an oxisol in the Brazilian Savannah. Bioscience Journal, 30 (5), 1459-1473.
- Bradford, M.N., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–54.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Porte, C., Sarasquette, C., Viarengo, A.T., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments in the Iberian Peninsula: A practical approach. Science Total Environmental, 9, 247–311.
- Carvalho, J., Cerri, C.E.P., Feigl, B.J., Piccolo, M.D.C., Herpin, U., Cerri, C.C., 2009. Conversion of Cerrado into agricultural land in the south-western Amazon: carbon stocks and soil fertility. Science Agriculture, 66 (2), 233–241.
- Carvalho, R.A., Cianciaruso, M.V., Trindade-Filho, J., Sagnori, M.D., Loyola, R.D., 2010. Drafting a blueprint for functional and phylogenetic diversity conservation in the Brazilian Cerrado. Natureza e Conservação 8, 171–176.
- Cavaliere, S.D., Silva, F.M.L., Velini, E.D., São José, A.R., Ulloa, S.M., Datta, A., Cavaliere, J.D., Knezevic, S.Z., 2012. Seletividade do nicosulfuron em três estádios fenológicos de milho-pipoca. Planta Daninha, 30 (2), 377-386.
- Ceccon, G., Rocha, E. M., 2009. Sistemas de produção de milho safrinha em Mato Grosso do Sul. In: Seminário Nacional de Milho Safrinha, Rio Verde, GO. Anais X Seminário Nacional de Milho Safrinha, Rio Verde: FESURV, 2009. p. 25-31.
- Chaâbani, G., Tabart, J., Kevers, C., Dommès, J., Khan, M. I., Zaoui, S., Karray-Bouraoui, N., 2015. Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid combined to 6-Benzylaminopurine on callus induction, total phenolic and ascorbic acid production, and antioxidant activities in leaf tissue cultures of *Crataegus azarolus* L. var. aronia. Acta Physiologiae Plantarum, 37(2), 1-9.
- Costa, A.G.F., Velini, E.D., Rossi, C.V.S., Corrêa, M.R., Negrisoli, E., Fiorini, M.V., Siono, L.M, 2014. Adjuvantes na deriva de 2,4-D + glyphosate em condições de campo. Ciência Rural, 44(3), 387-392.
- Costa, M.H., Pires, G.F., 2010. Effects of Amazon and central Brazil deforestation scenarios on the duration of the dry season in the arc of deforestation. International Journal of Climatology 30, 1970–1979.
- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loqués, F., Roméo, M., Salbert, V., 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. Chemosphere, 66(3), 574-583.

- Darwish, M., Vidal, V., Lopez-Lauri, F., Alnaser, O., Junglee, S., Maataoui, M., Sallanon, H., 2015. Tolerance to clomazone herbicide is linked to the state of LHC, PQ-pool and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 175, 122-130.
- Debona, D., Rodrigues, F.A., Rios, J.A., Nascimento, K.J.T., 2012. Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 102, 1121–1129.
- Del Longo, O.T., Gonzalez, C.A., Pastori, G.M., Trippi, V.S., 1993. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell and Physiology* 34, 1023–8.
- Dias, A.P.L., Dafré-Martinelli, M., Rinaldi, M.C.S., Domingos, M., 2011. How the redox state of tobacco Bel W-3 is modified in response to ozone and other environmental factors in a sub-tropical area? *Environmental Pollution*, 159, 458-465.
- Dixon, M.J., Harrigan, K.A., Sandhu, R., Collins, K., Fugelsang, J. A., 2010. Losses disguised as wins in modern multi-line video slot machines. *Addiction*, 105, 1819–24.
- Piva, F., Ciaprini, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., Regoli, F., 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: a practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 21, 47-54.
- Farinelli, R., Penariol, F.G., Fornasier Filho, D., 2012. Características agronômicas e produtividade de cultivares de milho em diferentes espaçamentos entrelinhas e densidades populacionais. *Científica, Jaboticabal*, 40(1), 21–27.
- Gay, C., Gebicki, J.M., 2000. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry*, 284, 217-220.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59, 309–14.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., Tezotto, T., Piotto, F.A., Peres, L.E.P., Azevedo, R.A., 2012. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 56, 79-96.
- Griboff, J., Morales, D., Bertrand, L., Bonansea, R.I., Monferrán, V., Asis, R., Wunderlin, D.A., Amé, M, V., 2014. Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentines*: The protective effect of vitamin E. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 1-8.
- Grossmann, G., Guo, W. J., Ehrhardt, D. W., Frommer, W. B., Sit, R. V., Quake, S. R., 2011. The RootChip: an integrated microfluidic chip for plant science. *Plant Cell*, 23, 4234–4240.
- Havir, E.A., Mc Hale, N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84, 450–5.
- Hodges, D.M., 1999 Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), p. 604-611.

- Kuo, M.C., Kao, C.H., 2003. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46, 149-152.
- Lambin, E.F., Gibbs, H.K., Ferreira, L., Grau, R., Mayaux, P., Meyfroidt, P., Morton, D.C., Rudel, T.K., Gasparri, I., Munger, J. Estimating the world's potentially available cropland using a bottom-up approach. *Global Environmental Change*, 23, 892-901, 2013.
- Lu, G.H, Ji, Y., Zhang, H.Z., Wua, H., Qin, J., Wang, C., 2010. Active biomonitoring of complex pollution in Taihu Lake with *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 79:588–94.
- Lugon-Moulin, N., Martin, F., Krauss, M.R., Ramey, P.B., Rossi, L. Cadmium concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from different countries and its relationship with other elements. *Chemosphere*, 63, 1074-1086, 2006.
- Lukatkin, A.S., Gar'kova, A.N., Bochkarjova, A.S., Nushtaeva, O.V., Silva, J.A.T., 2013. Treatment with the herbicide TOPK induces oxidative stress in cereal leaves. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105, 44-49.
- Lysenko, V.S., Varduny, T.V., Simonovich, E.I., Chugueva, O.I., Chokheli, V.A. Sereda, M.M., Gorbov, S.N., Krasnov, V.P., Tarasov, E.K., Sherstneva, I.Y., Kozlova, M.Y., 2014. Far-Red Spectrum of Second Emerson Effect: A Study Using Dual-Wavelength Pulse Amplitude Modulation Fluorometry. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 10(4), 234-240.
- Maheshwari, R., Dubey, R.S., 2009. Nickel induced oxidative stress and the role of antioxidant defense in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 59,37–49.
- Maran, E., Fernández, M., Barbieri, P., Font, G., Ruiz, M.J., 2009. Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 72, 922-930.
- Marchesan, E. D., Dedordi, G., Trezzi, M. M., Vidal, R. A., Dick, D. P., 2011. Seleção de espécies bioindicadoras para uso em bioensaios de lixiviação e persistência de atrazina no solo. *Pesticidas: revista*
- Martinelli, L.A., Naylor, R., Vitousek, P. M., Moutinho, P., 2010. Agriculture in Brazil: impacts, costs, and opportunities for a sustainable future. *Environmental Sustainability*, 2, (5-6), 431-438.
- Messina, J.P., Brady, O.J., Pigott, D.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Hay, S.I, 2014. A global compendium of human dengue virus occurrence. *Scientific Data* 1:140004. doi: 10.1038/sdata.2014.4
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–428.
- Miranda, S.C., Bustamante, M., Palace, M., Hagen, S., Keller, M. Ferreira, L.G., 2014. Regional variations in biomass distribution in Brazillian savana woodland. *Biotropica*, 46(2), 125-138.
- Muhitch, M.J., 1988. Acetolactate synthase activity in developing maize (*Zea mays* L.) Kernls. *Plant Physiology* 86, 23–27.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant, Cell and Physiology* 22, 867–80.



- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Revista Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 49,249–279.
- Nunes, A. L., Vidal, R. A., 2009. Seleção de plantas quantificadoras de herbicidas residuais. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 19, 19-28.
- Oliveira Jr, R. S., 2011. Mecanismo de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA JUNIOR, R. S. et al. (Ed.). *Biologia e manejo de plantas daninhas*, p. 141-192.
- Oliveira, O.C., Oliveira, I.P., Urquiaga, S., Alves, B.J.R., Boddey, R.M. Chemical and biological indicators of decline/degradation of brachiaria pastures in the Brazilian Cerrado. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 103(2), 289-300, 2004.
- Oruc, E.O., Sevgiler, Y., Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative biochemistry and Physiology*, 137, 43-51.
- OSPAR Commission 2012. Discharges of radionuclides from the nonnuclear sectors in 2010. *Radioactive Substances Series*, OSPAR Commission, Paris.
- Ozden, S., Catalgol, B., Gezginci-Oktayoglu, S., Karatug, A., Bolkent, S., Alpertunga, B., 2013. Acute effects of methiocarb on oxidative damage and the protective effects of vitamin E and taurine in the liver and kidney of Wistar rats *Toxicol. Ind. Health*, 29, 60–71.
- Pazmiño, D.M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Archilla-Ruiz, A., Del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2011. Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment* 34, 1874–1889.
- Pazmiño, D.M., Romero-Puertas, M.C., Sandalio, L.M., 2012. Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants. *Plant Signaling and Behaviour*, 7, 1–3.
- Pernía, B., Sousa, A. D., Reye, R., Castrillo, M., 2008. Biomarcadores de contaminação por cádmio em las plantas. *Interciência*, 33, 2.
- Pimentel, C., Sarr, B., Diouf, O., Abboud, A. C. S., Macauley, H. R., 2002. Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivados em campo. *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, 22, 07-14.
- Qiu, X., Wong, G., Audet, J., Bello, A., Fernando, L., Alimonti, J.B., Fausther-Bovendo, H., Wei, H., Aviles, J., Hiatt, E., Johnson, A., Morton, J., Swope, K., Bohorov, O., Bohorova, N., Goodman, C., Zobinger, G.P., 2014. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, 2014.
- Raftopoulou, E.K., Dimitriadis, V.K., 2010. Assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* along Thermaikos Gulf (Northern Greece): an integrative biomarker approach using ecosystem health indices. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 73, 1580–7.
- Ramos, H.H., Durigan, J.C., 1996. Avaliação da eficiência da mistura pronta de glyphosate + 2,4-D no controle da *Commelina virginica* L. em citros. *Planta Daninha*, 14, 33-41.
- Romero-Puertas, M.C., Mc Carthy, I., Gómez, M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Del Río, L.A., Palma, J.M., 2004a. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems

involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant, Cell and Environment* 27, 1135–1148.

Sandermann, H., 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochemistry Science*, 17, 82-84.

Schiesari, L., Waichman, A., Brock, T., Adams, C., Grillisch, B., 2013. Pesticide use and biodiversity conservation in the Amazonian agricultural frontier. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 368: 20120378.

Schuler, M.A., 1996. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15, 235–284.

Silva, D.T., Meirelles, S.T., Moraes, R.M., 2012. Relationship between ozone, meteorological conditions, gas exchange and leaf injury in *Nicotiana tabacum* Bel-W3 in a sub-tropical region. *Atmospheric Environment* 60, 211–216.

Sleimi, N., Guerfali, S., Bankaji, I. Biochemical indicators of salt stress in *Plantago maritima*: Implications for environmental stress assessment. *Ecological Indicators*, 48 (2015), pp. 570-577.

Sunohara, Y., Matsumoto, H., 2008. Quinclorac-induced cell death is accompanied by generation of reactive oxygen species in maize root tissue. *Phytochemistry*, 69, 2312-2319.

Tsangaris, C., Hatzianestis, I., Catsiki, V., Kormas, K.A., Stroglyoudi, E., Neofitou, C., Andral, B., Galgani, F., 2011. Active biomonitoring in Greek coastal waters: application of the integrated biomarker response index in relation to contaminant levels in caged mussels. *Science of the Total Environment*, 412-413, 358-365.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology Pharmacology*, 13, 57–149.

Van Vliet, N., Mertz, O., Heinemann, A., Langanke, T., Pascual, U., Schmook, B., Adams, C., Schmidt-Vogt, D., Messerli, P., Leisz, S., Castella, J., Jorgensen, L., Birch-Thomsen, T., Hett, C., Bech-Bruun, T., Ickowitz, A., Chi Vu, K., Yasuyuki, K., Fox, J., Padoch, C., Dressler, W., Ziegler, A.D., 2012 Trends, drivers and impacts of changes in swidden cultivation in tropical forest agriculture frontiers: a global assessment. *Global Environmental Change*, 22, 418–429.

Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham Thi, A.T., Vieira Silva, J. B. 1990. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *Journal of Experimental Botany*, 41, 827-32.

Vidal-Liñán, L., Bellas, J., 2013. Practical procedures for selected biomarkers in mussels, *mytilus galloprovincialis* – Implications for marine pollution monitoring. *Science of the Total Environment*, 461-462, 56-54.

Westerfeld, W.W., 1945. A colorimetric determination of blood acetoin, *Journal of Biological Chemistry* 161: 495–502.

Xing, H., Wang, X., Sun, G., Gao, X., Xu, S., Wang, X., 2012. Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 233–244.

## Legendas

**Figure 1.** Atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) [A-B], catalase (CAT) [C-D] e ascorbato peroxidase (APX) [E-F] de *Dipteryx alata* de acordo com a interação entre as doses do 2,4-D e das horas após aplicação (A, C e E) e de acordo com a interação entre as doses do nicosulfuron e das horas após aplicação (B, D e F). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro das doses, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são média e desvio padrão de  $n= 30$ .

**Figure 2.** Concentrações de peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$  de *Dipteryx alata* de acordo com a interação entre as doses do 2,4-D e das horas após aplicação (A) e de acordo com a interação entre as doses do nicosulfuron e das horas após aplicação (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro das doses, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são média e desvio padrão de  $n= 30$ .

**Figure 3.** Concentrações de malondialdeído (MDA) de *Dipteryx alata* submetidas às doses do herbicida 2,4-D (A) e às horas após aplicação (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são médias e desvio padrão de  $n= 5$ .

**Figure 4.** Concentrações de malondialdeído (MDA) de *Dipteryx alata*, de acordo com a interação entre as doses do nicosulfuron e das horas após aplicação. Médias seguidas da mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro das doses, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são médias e desvio padrão de  $n= 30$ .

**Figure 5.** Taxa de liberação de eletrólitos (TLE) de *Dipteryx alata*, submetidas a doses dos herbicidas 2,4-D (A) e nicosulfuron (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são médias e desvio padrão de  $n= 5$ .

**Figure 6.** Atividade da enzima celulase de *Dipteryx alata*, de acordo com a interação entre as doses do 2,4-D e das horas após aplicação. Médias seguidas de mesma letra maiúscula entre, e minúscula dentro das doses, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são média e desvio padrão de  $n= 30$ .

**Figure 7.** Atividade da enzima aceto lactato sintase de *Dipteryx alata*, de acordo com a interação entre as doses do nicosulfuron e horas após aplicação. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados são média e desvio padrão de  $n= 5$ .

**Figure 8.** Ausência de sintomas visuais em folhas de *Dipteryx alata* às 96 horas após aplicação do herbicida 2,4-D. Todas as barras da figura são na escala de 1 cm.

**Figure 9.** Sintomas visuais em folhas de *Dipteryx alata* às 216 horas após aplicação do herbicida nicosulfuron. Todas as barras da figura são na escala de 1 cm. Legenda: NC (necrose) e CL (clorose).

Figures

Fig. 1.

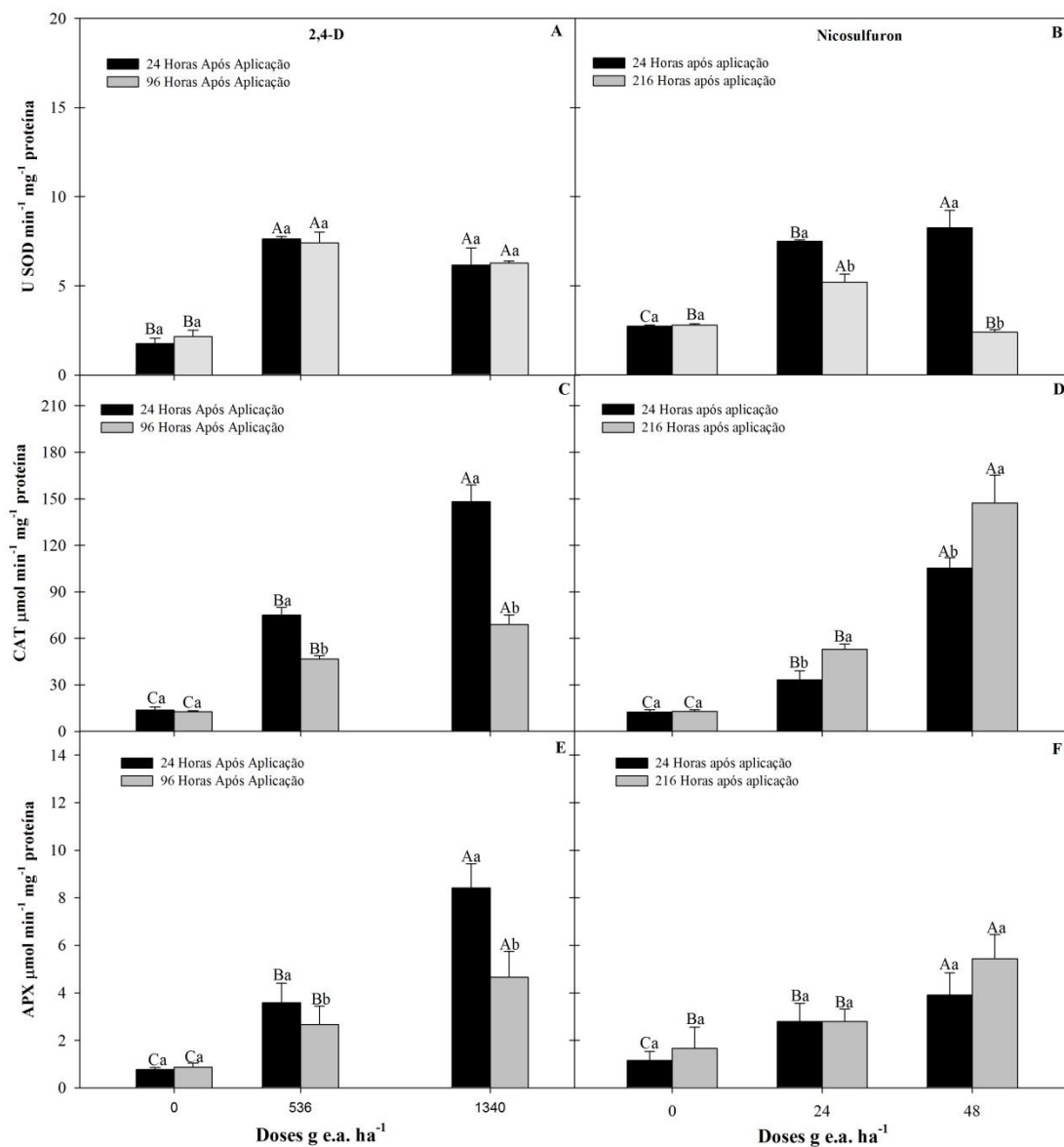


Fig. 2.

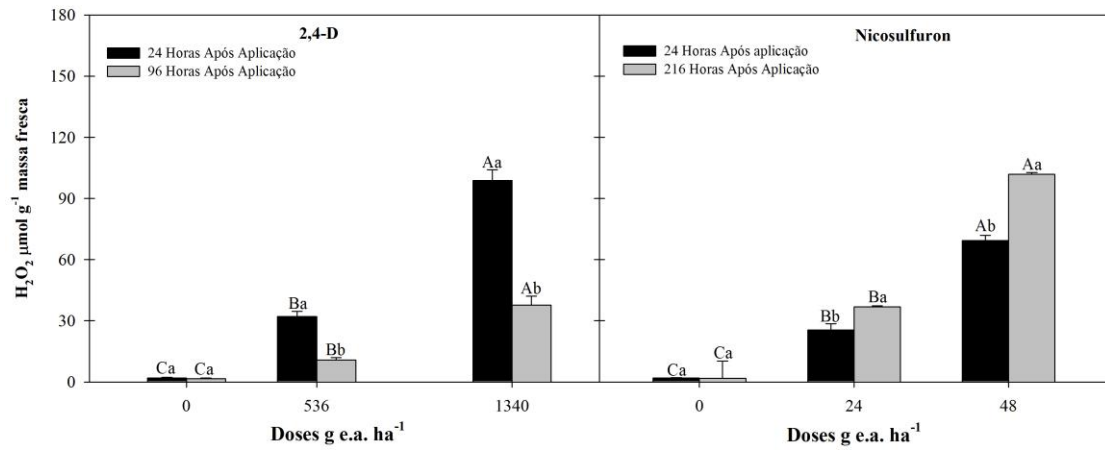


Fig.3.

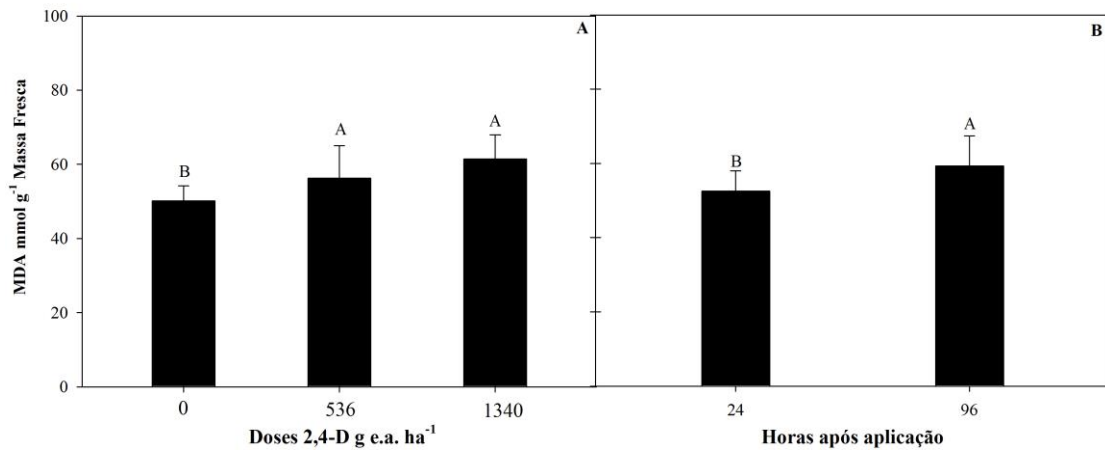


Fig.4.

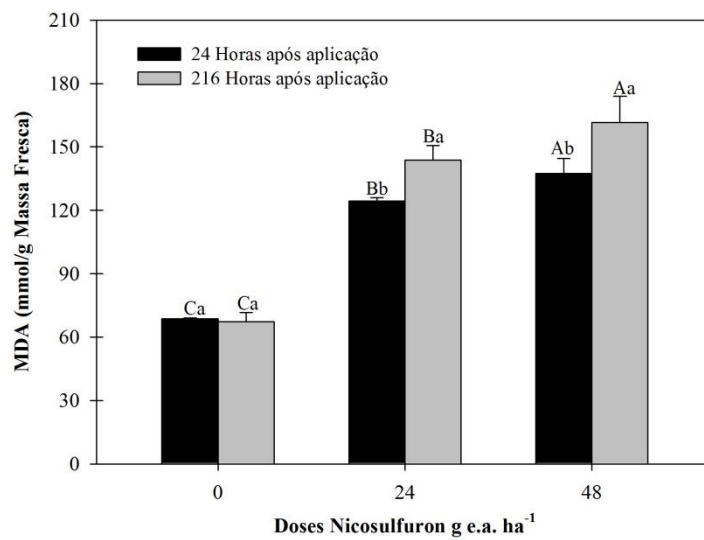


Fig.5.

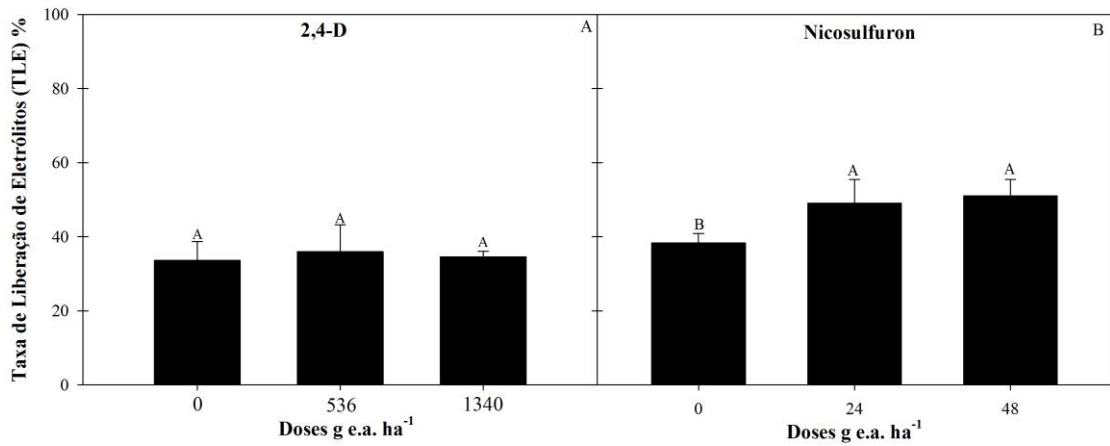


Fig.6.

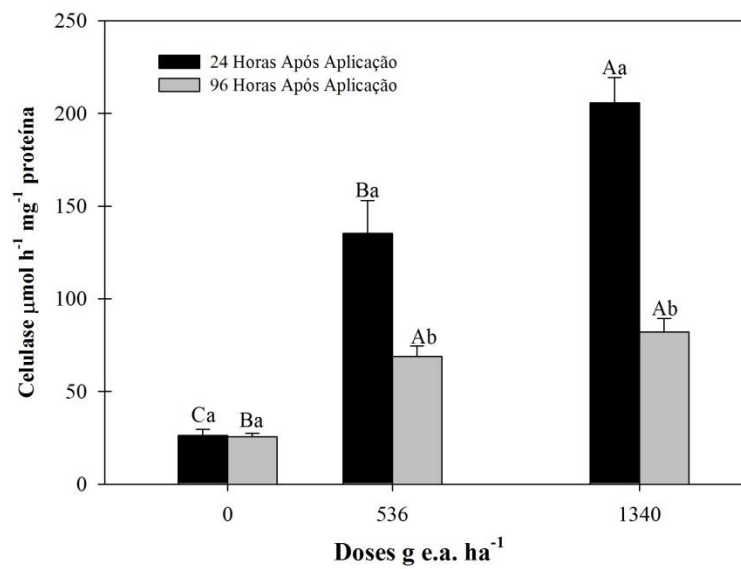


Fig.7.

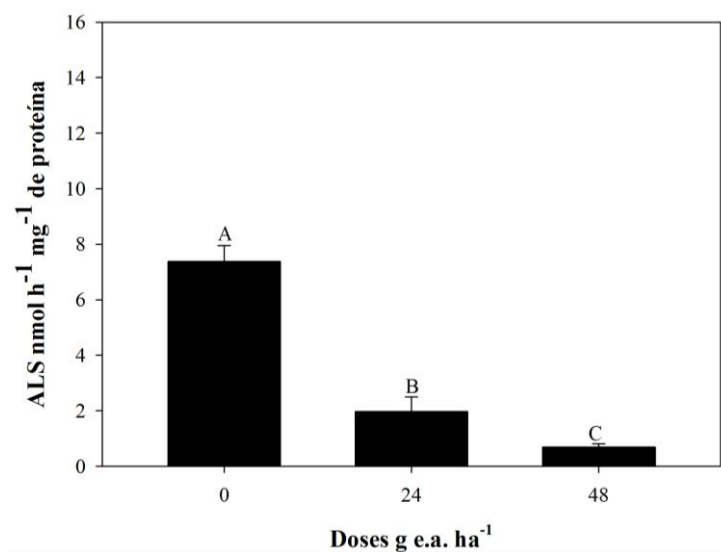


Fig. 8

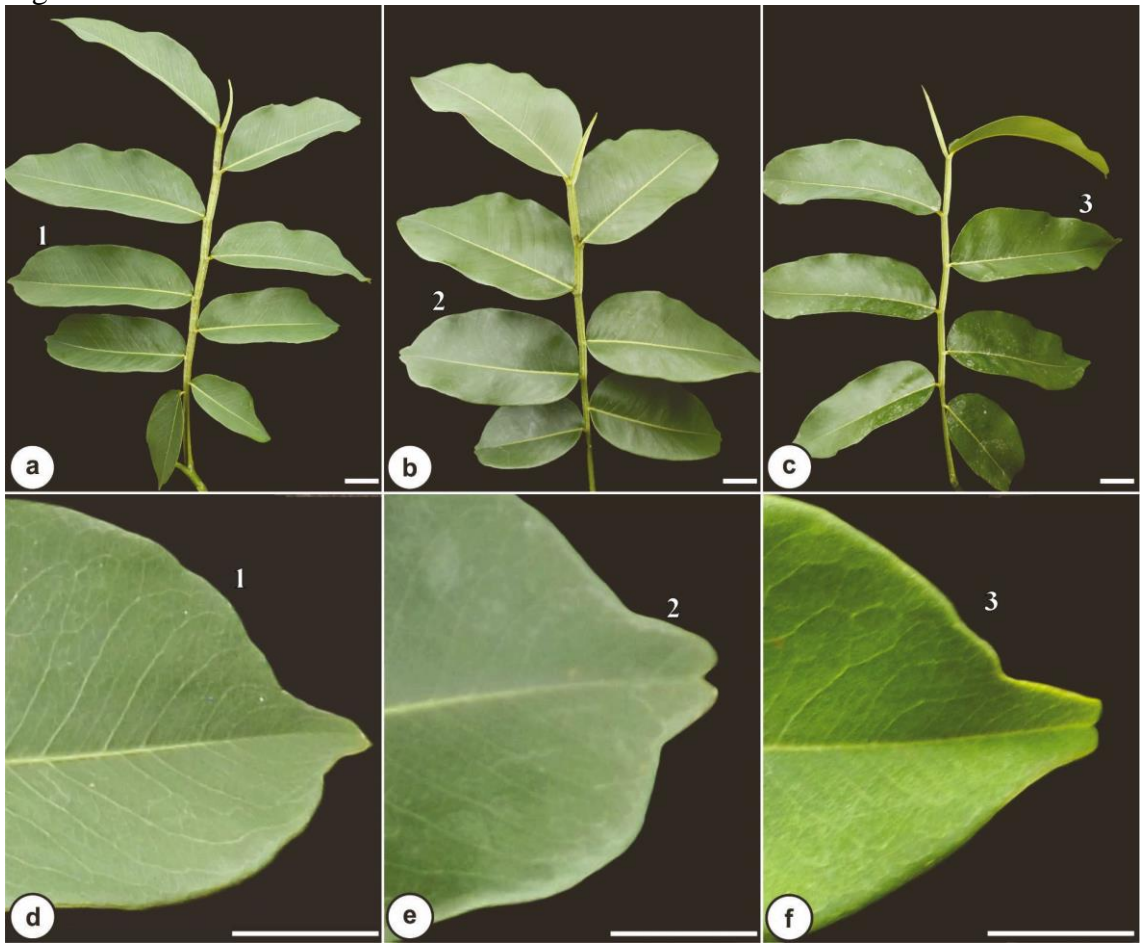
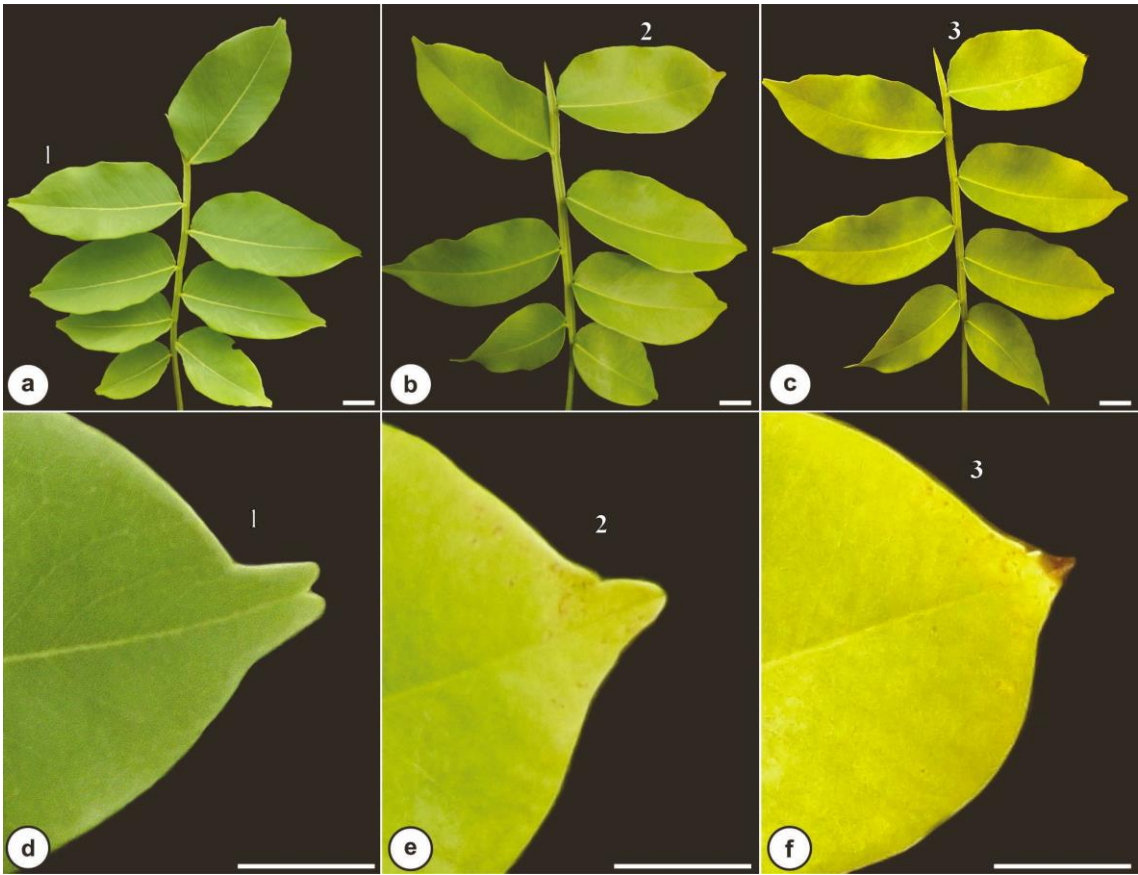


Fig. 9





## CONCLUSÃO GERAL

Os herbicidas 2,4-D e nicosulfuron promoveram efeitos em plantas de *Dipteryx alata* Vogel, como alterações nas trocas gasosas, na fluorescência da clorofila *a* e, na concentração de clorofila *a*, *b* e carotenoides. Além da maior atividade das enzimas do sistema antioxidante de defesa, aumento na concentração de peróxido de hidrogênio e de malonaldeído.

Os resultados demonstram que em folhas de *D. alata* os sintomas visuais, a redução na atividade da enzima aceto lactato sintase constituem biomarcadores específicos da ação do nicosulfuron.