

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS DE PLANTAS DE MILHO
SUBMETIDAS À APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE E FOSFITO**

GIOVANNA LARISSA GIMENES COTRICK GOMES

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU – SP

Fevereiro - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS DE PLANTAS DE MILHO
SUBMETIDAS À APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE E FOSFITO**

GIOVANNA LARISSA GIMENES COTRICK GOMES

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini

Co-Orientadora: Dra. Maria Lúcia Bueno Trindade

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU – SP

Fevereiro - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

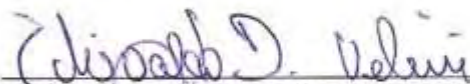
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: ALTERAÇÕES METABÓLICAS DE PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS
À APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE E FOSFITO**

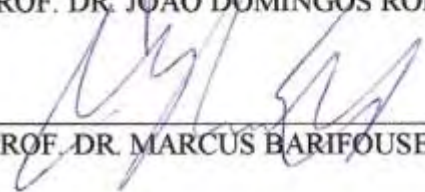
ALUNA: GIOVANNA LARISSA GIMENES COTRICK GOMES

ORIENTADOR: PROF. DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI


PROF. DR. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES
PROF. DR. MARCUS BARIFOUSE MATALLO

Data da Realização: 25 de fevereiro de 2011.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

G633a Gomes, Giovanna Larissa Gímenes Cotrick, 1985-
Alterações metabólicas de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito / Giovanna Larissa Gímenes Cotrick Gomes. - Botucatu : [s.n.], 2011

v, 97 f. : gráfs., tabs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011

Orientador: Edivaldo Domingues Velini

Co-orientador: Maria Lúcia Bueno Trindade

Inclui bibliografia

1. Metabolismo secundário. 2. Glyphosate. 3. Ácido químico. 4. Aminoácidos aromáticos. I. Velini, Edivaldo Domingues. II. Trindade, Maria Lúcia Bueno. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

Ao meu noivo Caio,

*pela compreensão, amor, apoio,
confiança e companheirismo.*

DEDICO

Aos meus avós Doraci e Vivaldo,

*pelo amor que sempre dispensaram
e por serem meus grandes exemplos de família.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e mais esta importante vitória.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, pela orientação, amizade e dedicação dispensada durante todo o período de pós-graduação.

À Maria Lúcia Bueno Trindade, co-orientadora e grande amiga, por toda a ajuda em muitos momentos.

Ao meu noivo e companheiro Caio Antonio Carbonari, pelo amor e amizade, pela indispensável ajuda, por compartilhar todos os momentos e ser a pessoa que ilumina a minha vida.

Aos meus pais Ivan Alexandre Cotrick Gomes e Ieda Regina Gimenes por todo amor, carinho e incentivo.

Às minhas queridas irmãs Julianna e Lucianna, por serem minhas grandes e melhores amigas.

Aos meus avós, Dora e Vadico, por absolutamente tudo, e por serem grandes responsáveis por mais esta conquista.

Aos amigos Rosilaine Araldi, Denise Tourino Rezende, Marcelo Giroto, Ilca Puertas Freitas e Silva e Leandro Tropaldi, pelos bons momentos de convívio e valiosas colaborações durante o período do curso de pós-graduação.

Aos amigos e funcionários do laboratório de Matologia, José Roberto M. Silva, Luis Claudio, José Guilherme Cordeiro e Marcelo Siono pelas preciosas colaborações durante a realização dos experimentos.

A todos os amigos da FEPAF, Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, em especial à Silvia Soler e Patricia Carnietto.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia / Proteção de Plantas, e à Faculdade de Ciências Agronômicas, pela oportunidade e formação.

A CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
4.1 A cultura do milho	8
4.2 Rota do ácido chiquímico	10
4.3 Fosfitos	13
4.4 Glyphosate	14
4.4.1 Modo de ação do glyphosate	18
4.4.2 Efeitos do glyphosate no metabolismo das plantas	21
4.4.3 Metabolismo do glyphosate pelas plantas	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 Experimentos em casa de vegetação	31
5.2 Metodologia analítica dos compostos	35
5.3 Extração dos compostos	43
5.4 Análise dos resultados	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1 Extrações dos compostos	47
6.2 Experimentos em casa-de-vegetação	50
7 CONCLUSÕES	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 RESUMO

O glyphosate é um herbicida de largo espectro de controle, não seletivo, e seu sítio de ação é a inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSPs). Com a inibição da enzima, e o bloqueio da rota do ácido chiquímico pelo glyphosate, ocorre o acúmulo de alguns compostos como os ácidos chiquímico e quínico, além de outras alterações metabólicas e fisiológicas nas plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações metabólicas e fisiológicas de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate isolado e em associação com fosfito. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP. Foi utilizado o híbrido de milho Pioneer 30F53, em vasos contendo 5 litros de substrato e os tratamentos foram compostos da aplicação de: glyphosate (72 g e.a. ha⁻¹); glyphosate (720 g e.a. ha⁻¹); glyphosate (72 g e.a. ha⁻¹) + fosfito (3 L p.c. ha⁻¹); glyphosate (720 g e.a. ha⁻¹) + fosfito (3 L p.c. ha⁻¹); fosfito (3 L p.c. ha⁻¹); e uma testemunha sem aplicação. Foram realizados dois experimentos, com os mesmos tratamentos, mas com avaliações distintas. No primeiro, foram realizadas cinco coletas de todas as folhas das plantas aos 2, 4, 6, 10 e 15 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos. No segundo experimento, foi realizada a medição do fluxo de transporte de elétrons (ETR) nas folhas jovens e maduras, avaliações visuais de intoxicação, medição da altura e quantificação da matéria seca ao final do experimento. As folhas coletadas foram secas e moídas e utilizadas para quantificação dos seguintes compostos: ácido chiquímico, ácido quínico, ácido desidrochiquímico, ácido

aminometilfosfônico (AMPA), glyphosate, fenilalanina, tirosina e triptofano. Foram também realizados testes de extração dos compostos para escolha da metodologia mais apropriada, e desenvolvimento dos métodos analíticos em LC-MS/MS. O método de extração dos compostos que se mostrou mais adequado foi a partir da massa seca das amostras e banho de ultrassom. O glyphosate e o AMPA foram detectados somente na maior dose aplicada, associada ou não ao fosfito, e foram observados para estes tratamentos as maiores concentrações de ácidos chiquímico, quínico e desidrochiquímico. O efeito do glyphosate sobre os teores de aminoácidos aromáticos foi apenas transitório, com redução desses compostos inicialmente e posterior aumento. A associação do fosfito de potássio com a menor dose do glyphosate testada aumentou a intoxicação das plantas de milho em relação à testemunha e à aplicação do glyphosate isoladamente na mesma dose. As plantas de milho sofreram decréscimo do fluxo de transporte de elétrons após a aplicação da maior dose de glyphosate associada ou não ao fosfito de potássio.

2 SUMMARY

METABOLIC EFFECTS IN CORN AFTER APPLICATION OF GLYPHOSATE AND PHOSPHITE

Botucatu, 2011, 97 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: GIOVANNA LARISSA GIMENES COTRICK GOMES

Adviser: Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

Co-adviser: Dra. MARIA LÚCIA BUENO TRINDADE

The glyphosate is a broad spectrum herbicide, non-selective, and the site of action is the inhibition of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPs). The inhibition of the enzyme results in a reduction in the synthesis of aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophan), and secondary compounds. The glyphosate block of the shikimic acid pathway and causes the accumulation of some compounds like shikimic acid and quinic acid, and other metabolic and physiological effects in plants. The objective of this study was to evaluate the metabolic and physiological effects in corn plants after application of glyphosate and phosphite. The experiment was carried out in greenhouse in the Faculty of Agronomic Sciences at São Paulo State University. It was used the corn Pioneer 30F53, planted in vases containing 5 liters of substrate. The treatments were: glyphosate (72 g a.e. ha⁻¹

¹), glyphosate (720 g a.e. ha⁻¹), glyphosate (72 g a.e. ha⁻¹) + phosphite (3 L ha⁻¹), glyphosate (720 g a.e. ha⁻¹) + phosphite (3 L ha⁻¹), phosphite (3 L ha⁻¹) and an untreated control. Two experiments were carried out with the same treatments but with different evaluations. At first, it were realized five samples of all corn plant leaves at 2, 4, 6, 10 and 15 days after application (DAA). The second experiment was performed the evaluation of the electron transport rate (ETR) in young and mature leaves, visual evaluations of intoxication, height and weight of the plants. The leaves collected were dried, grated and used to quantify the compounds: shikimic acid, quinic acid, 3-dehydroshikimic acid, aminomethylphosphonic acid (AMPA), glyphosate, phenylalanine, tyrosine and tryptophan. Extraction tests of compounds were conducted to choose the most appropriate and were development of analytical methods in LC-MS/MS. The extraction of the compounds that proved most appropriate was using the dry mass of samples. Glyphosate and AMPA were detected only at the highest dose applied, with or without the phosphite, and these treatments were observed the higher concentrations of shikimic acid, quinic acid and 3-dehydroshikimic acid. The effect of glyphosate on aromatic amino acids levels was only transient. The association of potassium phosphite with the lower dose of glyphosate increased the toxicity of corn in comparison to the control and the glyphosate isolated. The corn plants had a decrease in the electron transport rate (ETR) after application of the highest dose of glyphosate associated or not with potassium phosphite.

3 INTRODUÇÃO

O milho possui uma grande importância tanto no cenário nacional, como no mundial, sendo um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo, além de ser matéria-prima para a produção de biocombustíveis.

A interferência imposta pelas plantas daninhas na cultura do milho pode acarretar grandes prejuízos, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento das plantas. O controle de plantas daninhas pela utilização de herbicidas (controle químico) é um dos mais utilizados no mundo, sendo realizado em grande escala na cultura do milho.

O herbicida glyphosate é recomendado para aplicação em pré plantio da cultura do milho e em pós emergência das plantas daninhas, sendo não seletivo e de amplo espectro de controle. É absorvido pelas folhas e translocado preferencialmente via floema para as regiões meristemáticas das plantas. No solo, o glyphosate é rapidamente inativado, devido à adsorção pelos colóides, ou pela degradação microbiana, produzindo ácido aminometilfosfônico (AMPA) ou sarcosina. Há suspeitas de que o glyphosate seja também metabolizado pelas plantas, produzindo AMPA, glioxilato e sarcosina.

O sítio de ação do glyphosate é a inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSPs), que catalisa a reação de ligação do chiquimato-3-fosfato (S3P) com o fosfoenolpiruvato (PEP), para formar 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato. O glyphosate bloqueia então a via do ácido chiquímico, que é a principal rota de produção dos aminoácido aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano),

afetando também o fluxo de carbono na planta, sendo que sob condições normais, 20% do carbono fixado pelas plantas são direcionados para esta rota (Haslam, 1993). Com a inibição da enzima EPSPs pelo glyphosate, é observado um grande acúmulo de ácido chiquímico nas plantas, representando um forte dreno de carbono, desta forma, reduzindo a fotossíntese. Os aminoácidos aromáticos são precursores de proteínas em plantas, mas também de muitos metabólitos secundários, como pigmentos, flavonóides, auxinas, fitoalexinas, lignina e taninos, sendo assim, as plantas submetidas ao glyphosate podem ter a síntese desses compostos também alterada.

As plantas expostas de alguma maneira ao glyphosate, seja por aplicação do herbicida, ou pela deriva, podem sofrer uma série de alterações metabólicas, sendo que uma das mais proeminentes e estudadas é o acúmulo do ácido chiquímico (ou chiquimato) pelas plantas. São inúmeros os trabalhos que estudam o acúmulo deste composto em diversas espécies de plantas, decorrente da aplicação de diferentes doses do herbicida, podendo chegar até a 8% da matéria seca das plantas (Orcaray, 2010). Além do acúmulo do ácido chiquímico, alguns trabalhos têm demonstrado o acúmulo de ácidos hidroxibenzóicos, como o protocatecuico e o gálico, e do ácido quínico, que é um composto de estrutura semelhante ao ácido chiquímico, e precursor dos ácidos hidroxibenzóicos, mas pouco se sabe ainda sobre a dinâmica desses compostos na planta após a aplicação do glyphosate.

Com o bloqueio da rota de biossíntese dos aminoácidos aromáticos pelo glyphosate, ocorre uma redução na formação dos mesmos, afetando os processos da planta que demandam proteínas ou enzimas. No entanto, nem sempre ocorre a redução no teor de aminoácidos, sendo que o menos sensível ao bloqueio da rota é o triptofano, seguido de fenilalanina e tirosina. Este fato pode ser em função da presença de sistemas controladores de rotas, que podem compensar, ao menos em partes, a menor síntese de alguns dos compostos intermediários, desta forma, nem sempre é possível concluir que produtos distantes do sítio de ação do glyphosate, terão a sua síntese bloqueada ou reduzida.

Não estão ainda bem esclarecidos os efeitos metabólicos e fisiológicos das plantas após a inibição da EPSPs pelo glyphosate, sendo que a morte das plantas não está apenas relacionada com o bloqueio da rota de biossíntese dos aminoácidos aromáticos, mas também à falha na produção de um grande número de compostos secundários, ao desregulamento no fluxo de carbono na planta e à redução da síntese de proteínas.

Diversos autores relataram um possível efeito protetor do fertilizante foliar à base de fosfito de potássio, contra os efeitos fitotóxicos do glyphosate. No entanto, há controvérsias, com relatos de intoxicação de plantas de milho pela aplicação do fosfito, semelhantes àquelas causadas pelo glyphosate, pelo fato do herbicida apresentar um radical fosfito em sua fórmula estrutural.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar as alterações metabólicas e fisiológicas de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate isolado e em associação com o fosfito de potássio.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A Cultura do Milho

No agronegócio brasileiro, em termos de área explorada, a cultura do milho (*Zea mays* L.) é a segunda mais cultivada, atrás somente da cultura da soja. O Brasil é o quarto maior produtor mundial, com produção de 54 milhões de toneladas em 2009/2010, ficando atrás somente dos Estados Unidos, China e União Européia, com produção de 324, 162, e 56 milhões de toneladas, respectivamente (Agrianual, 2010).

Em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, o milho é um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo, perdendo em volume apenas para o trigo e o arroz, fornecendo produtos largamente utilizados para a alimentação humana, animal e matéria-prima para a indústria (Dourado Neto e Fancelli, 2000). Recentemente seu uso se ampliou com a produção de amido, álcool, adoçantes, óleos e agora surge também como fonte de biocombustíveis (Agrianual, 2010).

No Brasil, a produção de milho tem-se caracterizado pela divisão da produção em duas épocas de plantio: primeira safra é realizada na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre fim de agosto, na região Sul, até os meses de outubro ou novembro (Sudeste e Centro-Oeste), e no Nordeste esse período ocorre no começo do ano; e segunda safra ou “safrinha”, que se refere ao milho de sequeiro, plantado extemporaneamente,

em fevereiro ou março, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná e São Paulo (Garcia et al., 2006).

Apesar de estar entre os quatro maiores produtores mundiais, o Brasil não se destaca entre os países com maiores produtividades. No Brasil, em condições experimentais, há relatos de picos de produtividade próximos a 17 toneladas de grãos por hectare (Silva et al., 2006), no entanto, o que se observa, em geral, são produtividades baixas e irregulares, cerca de $4,3 \text{ t ha}^{-1}$ de grãos (CONAB, 2010).

As plantas de milho apresentam elevada capacidade em absorver e utilizar água e nutrientes, além de possuírem elevada capacidade de utilização de radiação solar. Todavia, a presença de plantas daninhas desde a fase inicial de desenvolvimento da cultura pode acarretar perdas, inclusive totais (Rajcan e Swanton, 2001). As perdas na cultura do milho variam de 13 a 85% em função da adoção ou não de alguma medida de controle das plantas daninhas (Carvalho et al., 2007). Por isso, o controle de plantas daninhas na cultura do milho assume notável importância quando se deseja alcançar o máximo potencial produtivo das plantas. Estima-se que as perdas devido à interferência das plantas daninhas em plantios de milho, tenham alcançado 6 milhões de tonelada na safra 2008/09 (Karam et al., 2009).

No mundo, o método de controle de plantas daninhas mais utilizado na cultura do milho é o químico, possibilitando a obtenção de elevadas produtividades (Radosevich et al., 1997). Estima-se que os herbicidas sejam aplicados em mais de 65% da área cultivada com milho no Brasil, sendo assim, a alta taxa de utilização deste método de controle de plantas daninhas permite identificar problemas enfrentados pelos agricultores como resultado da aplicação dos herbicidas, estando estes relacionados à própria aplicação, ao meio ambiente, à saúde humana e ao surgimento de plantas resistentes (Karam e Oliveira, 2007).

Dentre os herbicidas registrados para o controle das plantas daninhas da cultura do milho, destaca-se o glyphosate, que é um herbicida aplicado em pré plantio da cultura e pós emergência das plantas daninhas, do grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não seletivo e de ação sistêmica. Apresenta amplo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle das plantas daninhas anuais e perenes, tanto dicotiledôneas como monocotiledôneas. Além do milho, o glyphosate encontra-se registrado no Brasil para uso nas seguintes culturas: algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros,

coco, eucalipto, feijão, fumo, maçã, mamão, nectarina, pêra, pêssego, pinus, seringueira, soja, trigo, uva e pastagens (Rodrigues e Almeida, 2005).

4.2 Rota do Ácido Chiquímico

A via do ácido chiquímico, a principal rota comum de produção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, constitui uma parte do metabolismo somente de plantas e microorganismos, não sendo encontrada em animais (Herrmann e Weaver, 1999). Em plantas, acredita-se que esta rota está confinada nos plastídeos (Herrmann, 1995; Schmid e Amrhein, 1995; Mustafa e Verpoorte, 2005; Weber et al., 2005). Segundo Herrmann (1995), os aminoácidos aromáticos não são somente utilizados para a produção de proteínas em plantas, mas também como precursores de um grande número de metabólitos secundários (pigmentos, flavonóides, auxinas, fitoalexinas, lignina e taninos). Além disso, rotas intermediárias podem servir como substrato para outras vias metabólicas, incluindo a biossíntese de ácido quínico e produtos derivados, como o ácido clorogênico (Herrmann e Weaver, 1999). Estima-se que, sob condições normais de desenvolvimento, 20% do carbono fixado pelas plantas pode ser direcionado para a rota do ácido chiquímico (Haslam, 1993).

A rota do ácido chiquímico consiste em sete passos metabólicos (Figura 1), começando com a condensação de dois intermediários do metabolismo de carboidratos, o fosfoenolpiruvato (PEP), da glicólise, e eritrose 4-fosfato, da via pentose-fosfato, para formar 3-deoxi-d-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP), sendo catalisada pela enzima homodimérica 3-deoxi-d-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), que é ativada pelo triptofano, assim como pelo Mn^{2+} (Buchanan et al., 2000).

A segunda reação da via do ácido chiquímico é a eliminação do fosfato pela DAHP para gerar 3-desidroquinato (DHQ), que é catalisada pela DHQ sintase (DHQS), uma enzima monomérica com o peso molecular de 39,0, e sua atividade requer Co^{2+} e NAD^{+} como cofatores. O próximo passo é a desidratação do DHQ para 3-desidrochiquimato (DHS), catalizado pela DHQ desidratase, e em seguida a redução de DHS a chiquimato, catalisada pela chiquimato-desidrogenase (também conhecida como chiquimato $NADP^{+}$ oxidoreductase) (Herrmann e Weaver, 1999). A atividade desta enzima aumentou cerca de 20% seis dias após

o fermento mecânico de folhas de *Capsicum annum* L. (Diaz e Merino, 1997). Nos últimos dois passos descritos (terceiro e quarto) da rota, as enzimas que catalisam as reações são bifuncionais, e desempenham importante papel na regulação de metabólitos nos pontos de ramificação da rota para garantir a produção suficiente do composto desejado, e são encontradas no ponto de ramificação para a síntese de ácido quínico (Ding et al., 2007). Os compostos desidroquinato e desidrochiquimato podem ser direcionados para o metabolismo do ácido quínico (Bentley, 1990).

No quinto passo da rota, a enzima chiquimato quinase catalisa a fosforilação de chiquimato para produzir chiquimato-3-fosfato (S3P). No próximo passo ocorre a entrada da segunda PEP, que é condensada com S3P para formar 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico. Esta reação reversível é catalisada pela EPSPs, uma enzima monomérica de peso molecular 48,0 (Herrmann e Weaver, 1999), e constitui o único alvo molecular do herbicida glyphosate (Steinrucken e Amrhein, 1980). O glyphosate é competitivo com a PEP e não competitivo com o S3P, indicando que o mesmo se liga no complexo EPSPs-S3P (Buchanan et al., 2000). A última reação da rota é a eliminação do fosfato pela EPSP para formar corismato, e é catalisada pela corismato sintase (Balasubramanian et al., 1990; Hawkes et al., 1990).

Todos os intermediários do tronco principal da via do ácido chiquímico são potenciais pontos de ramificação levando a outras vias metabólicas (Bentley, 1990). O DHQ pode ser convertido a DHS ou a ácido quínico, um precursor do ácido clorogênico, um produto da condensação de ácido quínico (intermediário inicial da via do ácido chiquímico) e ácido caféico, intermediário final do metabolismo dos fenilpropanóides (Herrmann e Weaver, 1999).

O ácido clorogênico protege a planta contra o ataque de fungos (Maher et al., 1994), e através do acúmulo de altos níveis, serve como protetor UV em diversas plantas. Segundo Herrmann e Weaver (1999), o ácido quínico também pode acumular-se em algumas plantas, e tem sido considerado um reservatório de carbono para a biossíntese de compostos aromáticos. Os ácidos quínico e chiquímico são compostos que ocorrem freqüentemente em concentrações relativamente altas em tecidos verdes e não verdes de plantas herbáceas (Yoshida et al., 1975) e angiospermas lenhosas (Boudet, 1973).

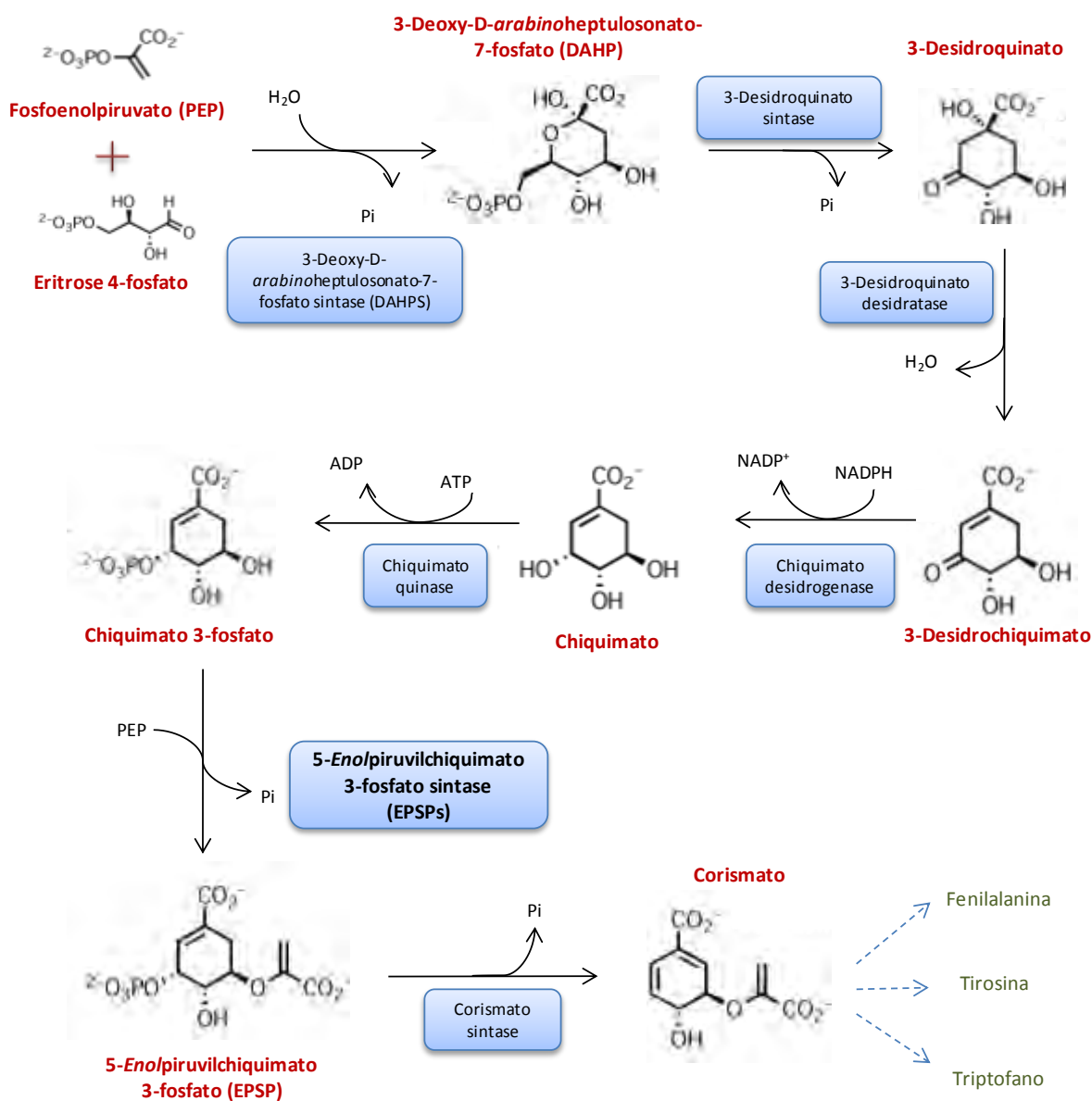


Figura 1. Esquema da rota do ácido chiquímico. Adaptado de Buchanan et al. (2000).

O corismato, produto final da via do ácido chiquímico, e o primeiro ponto de divisão da rota, é o precursor dos três aminoácidos aromáticos e outros compostos aromáticos do metabolismo primário. Assim, os três aminoácidos aromáticos são precursores de uma grande variedade de metabólitos secundários de plantas (Dewick, 1998). Os intermediários da rota do chiquimato também servem como ponto de partida para a biossíntese de produtos secundários. Dessa forma, esta via é de eminente importância para a síntese de

muitos compostos de interesse comercial (Herrmann e Weaver, 1999), os quais também dão origem a diversos compostos envolvidos na regulação do crescimento ou na defesa de plantas, destacando-se os taninos condensados, antocianinas, vitamina E, ácido indolacético (AIA), ácido salicílico, flavonas, isoflavonas, fenilpropanóides e cumarinas, fundamentais para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Velini et al., 2009).

4.3 Fosfitos

O termo fosfito é comumente referido como um sal de ácido fosforoso e o termo fosfonato é utilizado para um éster de fosfito que contém uma ligação carbono-fósforo (C-P) que é quimicamente distinto da ligação carbono-oxigênio-fósforo (C-O-P) encontrada no éster de fosfato (White e Metcalf, 2007).

A utilização dos fosfitos na agricultura possui as seguintes vantagens: baixo custo relativo da matéria-prima, a prevenção e controle das doenças produzidas por fungos, melhoria do estado nutricional das plantas, sobretudo nos estádios de maior aumento da atividade metabólica quando a aplicação do produto representaria um fornecimento suplementar de nutrientes, devido à absorção mais rápida de fósforo pela planta em comparação com produtos à base de fosfato, equilíbrio nutricional das plantas, melhor amadurecimento, prolongamento do tempo de conservação e qualidade superior dos frutos na pós-colheita (Nojosa et al., 2005).

Os fosfitos têm sido reconhecidos como excelentes fungicidas para o controle de muitas doenças importante causadas por Oomicetos, particularmente *Phytophthora* sp. (Fenn e Coffey, 1984; Forster et al., 1998; Jackson et al., 2000; Jee et al., 2002). No hospedeiro, o fosfito induz a biossíntese de etileno, aumento da respiração, ativação da fenilalanina amônia liase, lignificação e ativação do metabolismo das pentoses-fosfato (Reuveni e Reuveni, 1995).

Os fosfitos são rapidamente absorvidos pelas plantas, deslocando-se através das membranas celulares, devido ao seu alto grau de solubilidade e mobilidade, possuindo caráter sistêmico, permitindo ser aplicado de diversas formas como pulverização foliar, pincelamento ou imersão (Meneghetti, 2009).

Alguns autores têm demonstrado um possível efeito do fosfito na redução da intoxicação de algumas culturas quando aplicado o herbicida glyphosate (Castro, 2007; Ibrahim et al., 2010a; Ibrahim et al., 2010b). No entanto, Lucas et al. (1979), observaram severa intoxicação em plantas de milho quando tratadas com o fosfito, sendo que as injúrias foram muito semelhantes àquelas que o glyphosate causa nas plantas. Este fato pode ser explicado pelo trabalho de Mitchell e Adams (2004), que afirmaram que o glyphosate possui um grupo fosfito em sua fórmula estrutural (Figura 2), sendo assim, o mesmo poderia ter causado a injúria nas plantas.

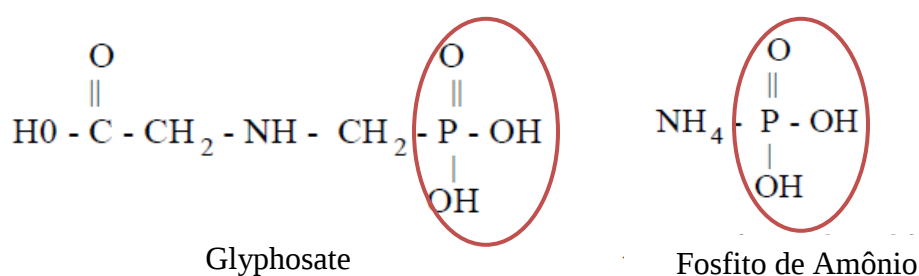


Figura 2. Fórmula estrutural do glyphosate e do fosfito de amônio. (Mitchell e Adams, 2004)

4.4 Glyphosate

Atualmente, o glyphosate é um dos herbicidas mais utilizados na agricultura, graças ao controle eficaz que exerce sobre as plantas daninhas e à sua baixa toxicidade aguda. O glyphosate (N-(fosfonometil)glicina) (Figura 3) é um herbicida aplicado em pós emergência das plantas, que geralmente é inativado no solo pela adsorção com os colóides ou pela rápida degradação microbiana (Gimsing et al., 2004). É um herbicida de ação sistêmica em pós emergência, possui um largo espectro de controle de plantas daninhas, mas não é seletivo para as culturas (Franz et al., 1997), exceto para as culturas geneticamente modificadas, sendo absorvido pelas folhas e translocado para os tecidos meristemáticos das plantas preferencialmente via floema. Sua eficácia é dependente da retenção da molécula na superfície foliar, da penetração foliar, da translocação na planta até o sítio de ação e da inibição da enzima EPSPs (Kirkwood e McKay, 1994). Caseley e Coupland (1985) indicam que o glyphosate segue a mesma rota dos produtos da fotossíntese (açúcares), indo das folhas

fotossinteticamente ativas em direção às partes das plantas que utilizam estes produtos, estabelecendo-se uma relação fonte-dreno.

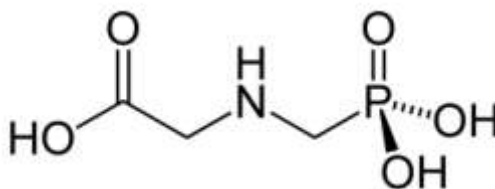


Figura 3. Fórmula estrutural do glyphosate.

A síntese do glyphosate é realizada a partir de um hidrogênio amínico do aminoácido glicina, por um radical de éster fosfônico (N-fosfonometil glicina), sua fórmula molecular é $C_3H_8NO_5P$, e massa molecular de $169,1 \text{ g mol}^{-1}$. No ano de 1964 a molécula foi originalmente sintetizada como potencial agente quelante industrial, e o seu uso como herbicida foi descrito em 1971 (Luchini, 2009). Possui diferentes formulações, sendo fabricado como sal isopropilamina, formulação concentrado solúvel, com 360 gramas de equivalente ácido (e.a.); como sal de amônio, formulado em grânulos dispersíveis em água, com $720 \text{ g e.a. kg}^{-1}$; ou sal potássico, formulação concentrado solúvel, com $500 \text{ g e.a. kg}^{-1}$ (Gazziero et al., 2009).

O glyphosate é muito pouco solúvel em solventes orgânicos comuns, e bastante solúvel em água, tem um elevado coeficiente de adsorção ao solo ($K_d=61 \text{ g cm}^{-3}$), principalmente aos óxidos de alumínio e ferro, meia vida em torno de 47 dias (Centeno, 2009) e coeficiente de partição octanol/água muito baixo ($K_{ow}=0.00033$), por isso apresenta baixa mobilidade, com pouca tendência para lixiviação no solo (Linders et al., 1994). Apresenta-se como um produto altamente solúvel em água (11600 mg L^{-1} a 25°C), com baixa pressão de vapor ($7.5 \times 10^{-8} \text{ mm Hg}$) e ponto de fusão a $189,9^\circ\text{C}$ (Franz et al., 1997).

No momento em que o glyphosate atinge o solo, a tendência é que o mesmo seja sorvido rápida e fortemente à fração coloidal, através de ligações similares às do fosfato inorgânico. Quando o glyphosate encontra-se disponível na solução do solo, é degradado rapidamente pelos microorganismos a AMPA e CO_2 (Regitano, 2009). Os grupos funcionais do glyphosate, como amina, carboxila e fosforados, podem simultaneamente

ligarem-se a íons metálicos formando quelatos, além de serem adsorvidos por óxidos de ferro, ocorrendo a rápida inativação como herbicida em contato com o solo (McBride, 1994). Muitos estudos tentam explicar os mecanismos de ligação do glyphosate com o solo, como a troca de ligantes com os óxidos de ferro e alumínio e as pontes de hidrogênio formadas entre o glyphosate e as substâncias húmicas do solo (Feng e Thompson, 1990; Miano et al., 1992; Prata et al., 2000).

Diversos trabalhos relatam que o mecanismo de adsorção proposto para a interação glyphosate-solo é similar ao mecanismo de ligação do fosfato inorgânico, existindo uma competição entre o glyphosate e o fosfato pelos sítios de adsorção (McBride e Kung, 1989; Gimsing e Boggaard, 2002). Prata et al. (2003), estudando a adsorção e dessorção do glyphosate em solos com diferentes concentrações de fósforo, observaram que quanto maior a dose de fósforo presente no solo, maior é a extração do glyphosate adsorvido, e que a adsorção do glyphosate pelo solo se deve à formação de complexos com os metais dos óxidos, processo que também está relacionado à capacidade dos solos adsorver fosfato. Segundo Toni et al. (2006), a dessorção do glyphosate pelo fosfato nos solos depende de diversos fatores, como CTC, quantidades de argilas presentes, quantidade de fosfato e pH do solo, com isso pode haver uma diminuição na produtividade de certas plantas.

O glyphosate pertence à classe de compostos conhecidos como ácidos fosfônicos, que contém uma ligação direta de carbono-fósforo (Kertesz et al., 1994), que é quimicamente estável, mas os microorganismos possuem habilidade enzimática de clivar a ligação e liberar fosfato inorgânico (Araújo, 2002).

A rota preliminar de decomposição do glyphosate no ambiente é a degradação no solo (Franz et al., 1997), realizada por uma grande variedade de microorganismos, que usam o produto como fonte de energia e fósforo, através de duas rotas catabólicas (Figura 4), produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA) como principal metabólito, ou pela clivagem da ligação C-P, por ação da enzima C-Piase, produzindo sarcosina como metabólito intermediário na rota alternativa (Franz et al., 1997; Dick e Quinn, 1995). Segundo Cox (1998), o AMPA é mais persistente no solo do que o glyphosate, pois a degradação do AMPA é mais lenta, possivelmente por ser adsorvido mais facilmente às partículas do solo. Gimsing et al. (2004) encontraram correlação positiva entre a mineralização

do glyphosate e o tamanho da população de *Pseudomonas* spp. nos solos estudados, sendo que esses microorganismos são os principais controladores da mineralização.

Sprankle et al. (1975) sugerem algumas explicações para o rápido desaparecimento do glyphosate do ambiente, como a rápida degradação microbiana, a degradação química, a adsorção ao solo, ou vários destes fatores combinados.

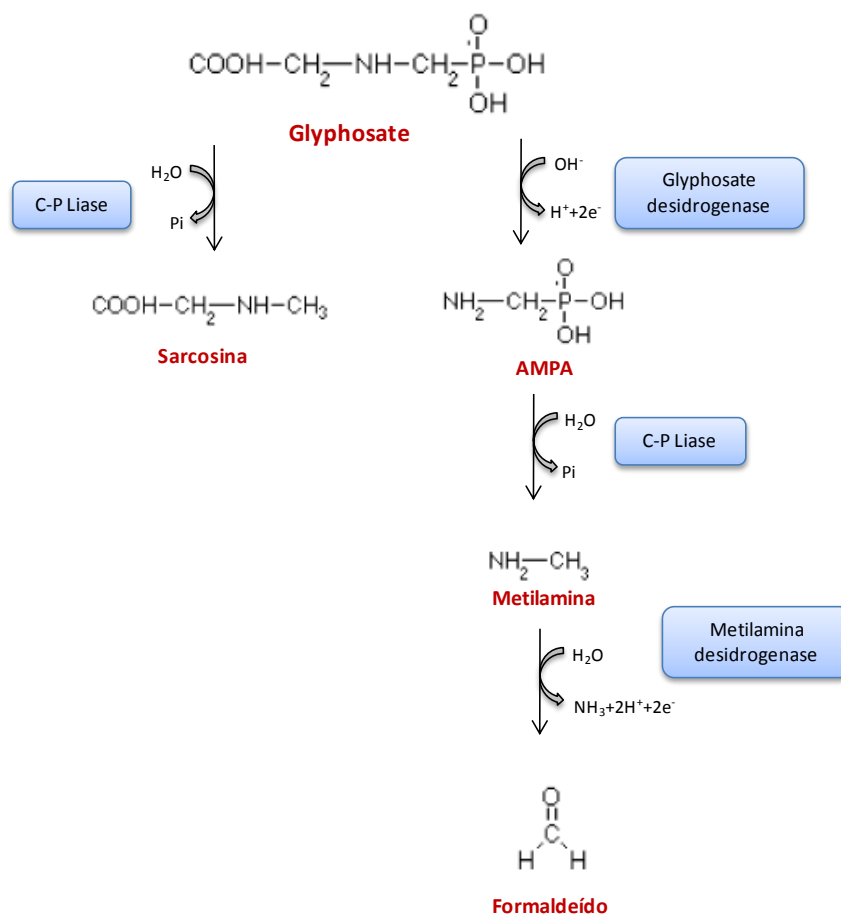


Figura 4. Rota de degradação microbiana do glyphosate no ambiente (Adaptado de Robyn Wirsema, Michael Burns e Doug Hershberger – Universidade de Minnesota).

4.4.1 Modo de Ação do Glyphosate

O modo de ação de um herbicida corresponde aos eventos que ocorrem desde o seu contato inicial com as plantas, a penetração (no apoplasto, reversível e sem gasto de energia), a absorção (para o simplasto, irreversível e com gasto energético), a movimentação na planta (entre órgãos, tecidos, células e organelas), o metabolismo e outras formas de inativação ou ativação, a interação com o sítio de ação até o desencadeamento de eventos que efetivamente levam as plantas à paralisação do crescimento ou à morte (Velini et al., 2009).

A maioria dos herbicidas inibem uma proteína ou uma enzima nas plantas (Cole et al., 2000). Os herbicidas inibidores de aminoácidos inibem uma enzima da planta e conseqüentemente bloqueiam a biossíntese dos blocos de construção das proteínas, os aminoácidos (Tan et al., 2006). Os animais não sintetizam todos os aminoácidos necessários, mas obtêm alguns aminoácidos de plantas ou bactérias, sendo assim, herbicidas que inibem a biossíntese de aminoácidos tem um menor impacto sobre animais do que os herbicidas com outros modos de ação (Reade e Cobb, 2002).

O glyphosate é absorvido preferencialmente pelas folhas, principalmente pelo floema, sendo um processo bifásico, com uma rápida penetração inicial pela cutícula seguida por uma absorção simplástica lenta, influenciado pelas características da planta, condições ambientais, concentração do herbicida, surfatante utilizado e método de aplicação (Monquero et al., 2004; Caseley e Coupland, 1985; Franz et al., 1997). Segundo Townson e Butler (1990), com a redução do volume de aplicação e aumento da concentração do glyphosate na calda de pulverização, normalmente sua absorção é aumentada.

A principal dificuldade para a absorção pela parte aérea é a existência de estruturas anatômicas, como o aparecimento de tecido suberificado nas regiões velhas e a deposição de cutina, formando a cutícula nas folhas, destinadas a impedir o dessecamento da planta, que impede a livre movimentação de gases e soluções (Rodrigues, 2009). Chachalis et al. (2001) afirmam que diferenças com relação ao grau de hidrofobicidade da cutícula devido à sua composição, podem refletir na absorção do glyphosate, resultando em menor eficiência do produto quando a cutícula é mais hidrofóbica.

Após a penetração do glyphosate através da cutícula e membrana plasmática dos tecidos fotossintetizantes, ocorre a translocação no simplasto, através dos tecidos vasculares, até o sítio de ação do herbicida (Satichivi et al., 2000), que é um processo essencial para a eficácia do herbicida (Wanamarta e Penner, 1989). O transporte do glyphosate pelo floema já foi demonstrado em várias espécies (Sprankle et al., 1975; Schultz e Burnside, 1980; Schultz e Amrhein, 1984; Honegger et al., 1986).

Além do transporte de longa distância, deve-se notar que a penetração do glyphosate nas células deve ocorrer em cada célula que possui a enzima alvo (Morin et al., 1997). Em algumas espécies como *Convolvulus arvensis* (Honegger et al., 1986), *Beta vulgaris* (Gougler e Geiger, 1981), e *Vicia faba* (Ibaoui et al., 1986), o glyphosate é transportado para dentro das células por absorção passiva não facilitada, mas dados cinéticos mais detalhados têm mostrado em *V. faba*, que o glyphosate pode ser absorvido por transportadores de fosfato da membrana plasmática (Denis e Delrot, 1993). Hetherington et al. (1998) verificaram que quando o glyphosate está em baixas concentrações no apoplasto, um mediador ativo é responsável por sua absorção, provavelmente um transportador de fosfato, já quando o produto se encontra em altas concentrações, o processo predominante é a difusão.

A translocação do glyphosate pelo floema segue a mesma rota dos açúcares produzidos na fotossíntese, deslocando-se das folhas para as raízes ou frutos, onde serão utilizados na respiração, assimilação ou acumulação depois de sua conversão à substâncias como amido, por exemplo (Rodrigues, 2009). O movimento do herbicida na planta é então influenciado pela quantidade de açúcar translocada para cada uma dessas partes durante o ciclo de vida da planta (Monquero et al., 2004). Dessa forma, a translocação do glyphosate é facilitada por condições que favoreçam a fotossíntese na planta (Dellacioppa et al., 1986).

O sítio de ação do glyphosate é a inibição da enzima EPSPs (5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase, E.C. 2.5.1. 19) que catalisa a reação na qual chiquimato-3-fosfato (S3P) reage com fosfoenolpiruvato (PEP), formando 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato (EPSP) e fósforo inorgânico (P_i) (Franz et al., 1997). Essa reação ocorre em duas etapas: a ligação da enzima EPSPs ao S3P, formando o complexo EPSPs-S3P, com posterior ligação da PEP neste complexo. A EPSPs é codificada no núcleo, e

a biossíntese dos aminoácidos aromáticos ocorre primariamente nos plastídeos (Vaughn e Duke, 1991; Reade e Cobb, 2002).

A inibição da enzima EPSPs pela ação do glyphosate, afeta a rota metabólica do ácido chiquímico, a qual produz os três aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Além disso, essa rota é responsável pela formação dos compostos fenólicos, que podem representar até 35% da biomassa vegetal (Boudet et al., 1985).

Com a inibição da enzima EPSPs, ocorre uma interferência na entrada de carbono na rota do chiquimato pelo aumento da atividade da enzima 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), que catalisa a condensação de eritrose-4-fosfato com PEP, considerada a enzima reguladora da rota (Devine et al., 1993). O aumento da atividade da DAHPS deve-se aos baixos níveis de arogenato, que é um inibidor alostérico da DAHP, e é um composto posterior à EPSP na rota. Com a redução da inibição pelo arogenato, a DAHPS continua atuando, o que provoca altos níveis de ácido chiquímico, já que a rota é interrompida pela inibição da EPSPs. Doses subletais de glyphosate causam um aumento na atividade da DAHPS *in vivo* (Pinto et al., 1988). *In vitro* este herbicida não tem efeito sobre a atividade da enzima. No entanto, pela inibição da EPSPs, o herbicida reduz a produção de corismato *in vivo*, iniciando assim um sinal que leva ao aumento do fluxo de carbono através da elevação da atividade da DAHPS (Herrmann e Weaver, 1999).

Quando as plantas são mecanicamente feridas ou sofre o ataque de insetos ou microorganismos, a maior parte do aumento da demanda por corismato pode ser para o aumento da síntese de lignina, para reparar as lesões. Aparentemente, a DAHPS desempenha importante função no controle da biossíntese de lignina (Jones et al., 1995).

A quantidade de ácido chiquímico acumulado pela desregulação da rota representa um forte dreno de carbono no ciclo de Calvin, pelo desvio de eritrose-4-fosfato que seria empregado na regeneração de ribulose bifosfato. Esse é um importante efeito da inibição causada pelo glyphosate, que reduz drasticamente a produção fotossintética (Geiger et al., 1986; Geiger et al., 1987; Serviates et al., 1987; Shieh et al., 1991).

Acredita-se que existe uma estreita sobreposição dos sítios de ligação da PEP e do glyphosate na EPSPs (Franz et al., 1997; Dill, 2005). O glyphosate se liga ao complexo EPSPs-S3P no lugar da PEP, e sua afinidade com o mesmo é 75 vezes maior do que a do PEP e a velocidade de dissociação do glyphosate do sítio de ação é 2000 vezes menor do

que a do PEP (Ream et al., 1992). O glyphosate é competitivo com a PEP pela ligação com a EPSPs, mas não competitivo com o chiquímato-3-fosfato (Mousdale e Coggins, 1991; Vaughn e Duke, 1991, Franz et al., 1997, Dill, 2005). Reade e Cobb (2002) salientaram que o glyphosate não se liga ao sítio ativo da EPSPs, mas se liga a um possível sítio alostérico, resultando em alterações estruturais do sítio de ação, prevenindo a ligação da PEP.

Dessa forma, ocorre a redução da biossíntese dos aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina), proteínas e compostos secundários (Bentley, 1990; Franz et al., 1997) e causa o acúmulo de ácido chiquímico e alguns ácidos hidroxibenzóicos em folhas e outros órgãos, tais como ácidos protocatecuico e gálico, que são formados a partir da DHS (Lydon e Duke, 1988; Becerril et al., 1989; Hernandez et al., 1999).

Os sintomas típicos de intoxicação das plantas pelo herbicida glyphosate são a paralisação do crescimento, o amarelecimento dos meristemas e das folhas jovens, folhas com estrias ou avermelhadas com posterior necrose e morte das plantas (Karam e Oliveira, 2007).

4.4.2 Efeitos do Glyphosate no Metabolismo das Plantas

Uma das principais alterações metabólicas causadas nas plantas decorrente da aplicação ou pela deriva do glyphosate nas plantas é o acúmulo do ácido chiquímico. Diversos autores puderam correlacionar a intoxicação das plantas pelo glyphosate com o acúmulo do ácido chiquímico (Reddy et al., 2010; Orcaray et al., 2010; Matallo et al., 2009; Reddy et al., 2008; Buehring et al., 2007; Nandula et al., 2007; Petersen et al., 2007; María et al., 2006; Feng et al., 2004; Singh e Shaner, 1998; Haring et al., 1998).

Mattallo et al. (2009), testando doses de glyphosate e monitorando o acúmulo de ácido chiquímico em plantas de *Brachiaria decumbens*, observaram um aumento no nível do composto, aos sete dias após os tratamentos, quando foi aplicada as doses de 360, 720 e 1440 g e.a. ha⁻¹ do glyphosate. No mesmo trabalho foram testadas diferentes concentrações de glyphosate (10, 20 e 30 mM) em raízes e brotos de soja (não resistente ao glyphosate), e verificou-se que o herbicida causa o acúmulo de ácido chiquímico em todos os

tratamentos e tecidos, com aumento dos efeitos em concentrações crescentes, atingindo cerca de 1% do peso seco dos tecidos.

Em estudo realizado por Reddy et al. (2010), avaliando o acúmulo de chiquimato em híbridos de milho não resistentes ao glyphosate (Pioneer 31P41) com a aplicação de 105 g e.a. ha⁻¹, 3 ou 6 dias após o plantio, observaram níveis elevados de ácido chiquímico, de 24 a 86% de aumento, independente do momento da aplicação. Mesmo aos 32 dias após o tratamento, as plantas de milho submetidas à aplicação do glyphosate, apresentaram maiores concentrações de ácido chiquímico (8,1 ng ml⁻¹) do que as plantas não tratadas (6,5 ng ml⁻¹).

Reddy et al. (2008) estudando o acúmulo de chiquimato em onze espécies de plantas após a aplicação do glyphosate, observaram altos níveis do composto em todas as plantas, com exceção da soja resistente ao glyphosate, e do milho resistente e suscetível ao glyphosate. Nas plantas não tratadas, níveis que variaram de 2 a 904 µg g⁻¹ foram encontradas em *Abutilon theophrasti* e *Lolium perenne* L. ssp. *Multiflorum*, respectivamente. Já nas plantas tratadas com glyphosate, os níveis de ácido chiquímico encontrados variaram de 53 µg g⁻¹ nos tecidos de soja resistente ao herbicida a 16530 µg g⁻¹ nos tecidos de caupi.

Foram também detectados altos níveis de chiquimato em *Brassica napus* L., em estudo conduzido por Petersen et al. (2007). O experimento foi realizado com plântulas de *B. napus* expostas a solução contendo várias concentrações do herbicida glyphosate (0; 1; 5; 10; 20; 30 e 50 µM) e nove dias após o tratamento as plântulas foram removidas e armazenadas para posterior quantificação do ácido chiquímico. Para as plântulas não expostas, ou expostas a 1 µM de glyphosate, o ácido chiquímico não foi detectado. As plântulas submetidas à faixa de 10 a 50 µM de glyphosate tiveram uma resposta linear de acúmulo de ácido chiquímico, confirmando que o glyphosate pode ser absorvido pelas plantas via sistema radicular, mesmo em concentrações subletais, onde não havia nenhum sinal visual de intoxicação, ou redução do peso seco da parte aérea (Petersen et al., 2007).

María et al. (2006) avaliaram os efeitos da aplicação de diversas concentrações de glyphosate (0; 1,25; 2,5; 5 e 10 mM) sobre folhas (jovens e maduras) e nódulos de *Lupinus albus* L. cv. Multolupa, e verificaram aumento nos níveis de ácido chiquímico em plantas tratadas com glyphosate em paralelo com as doses testadas e o tempo de exposição. Diferenças significativas nos níveis de chiquimato puderam ser observadas 1 dia

após a aplicação, mesmo na menor dose utilizada (1,25 mM), tanto nas folhas jovens como nas maduras. Pôde ser observado também, que o glyphosate foi rapidamente translocado das folhas para os nódulos (24 horas após a aplicação), sendo que este efeito foi evidente pelo grande acúmulo de ácido chiquímico nos nódulos nos tratamentos acima de 2,5 mM de glyphosate.

Em estudo realizado por Orcaray et al. (2010), o principal composto acumulado após a aplicação de glyphosate em plantas de ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Snap Sugar Boys), também foi o ácido chiquímico, representando até 8% da matéria seca das plantas no final do período do estudo, embora o acúmulo já era bastante evidente aos três dias após a aplicação do tratamento. Similarmente ao acúmulo do ácido chiquímico, os mesmos autores observaram um rápido acúmulo de dois ácidos hidroxibenzóicos (ácido protocatecuico e ácido gálico) aos três dias e um dia após o tratamento com glyphosate, respectivamente, sendo este também um efeito característico deste herbicida (Lydon e Duke, 1988; Becerril et al., 1989). O bloqueio da via do chiquimato no nível da EPSPs desregula o fluxo de carbono na rota (Jensen, 1986), causando uma entrada massiva de carbono que causa o acúmulo de compostos acima do ponto de inibição da EPSPs.

As células de plantas superiores contém um composto de estrutura semelhante ao ácido chiquímico, chamada ácido quínico (Orcaray et al., 2010), que pode ser sintetizada na planta de duas formas: a partir da DHQ, catalisada pela DHQ desidrogenase, e a partir do ácido chiquímico (Bentley, 1990; Leuschner et al., 1995). Vários metabólitos, tais como ácidos protocatecuico e gálico, que são formados em ramos laterais da rota, acumulam após o tratamento com glyphosate. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito desse herbicida sobre o conteúdo de ácido quínico (Orcaray et al., 2010).

O ácido quínico é um composto que ocorre relativamente em altas concentrações em tecidos verdes e não verdes de plantas herbáceas (Yoshida et al., 1975), em tecidos jovens de coníferas (Ossipov e Aleksandrova, 1982), e frutas (Albertini et al., 2006). Ossipov e Aleksandrova (1986) relataram aumento no fluxo de carbono no sentido da síntese de ácido quínico em acículas de pinheiro após a aplicação de glyphosate.

Segundo Orcaray et al. (2010), o ácido quínico pode ser um composto reserva da via do ácido chiquímico, mas seu papel fisiológico ainda não está completamente esclarecido. Em estudo realizado pelos mesmos autores, foi observado acúmulo de ácido

quínico em folhas de ervilha tratadas com os herbicidas imazethapyr, chlorsulfuron e glyphosate, 2,4; 1,6 e 1,4 vezes, respectivamente, comparados com a testemunha, aos 15 dias após os tratamentos.

A rota do ácido chiquímico, como já mencionado anteriormente, é responsável pela produção dos três aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), fundamentais para a continuidade da síntese protéica nas plantas. Todas as enzimas demandam tais aminoácidos. Portanto, com a redução desses aminoácidos nas plantas, todos os processos que demandam a participação de proteínas/enzimas são diretamente afetados. No entanto, os resultados obtidos em experimento realizado por Petersen et al. (2007), não revelam um claro decréscimo no conteúdo desses aminoácidos em *B. napus* expostas a concentrações de glyphosate em comparação com as plantas testemunhas. Neste mesmo estudo, os autores verificaram um grande aumento no teor de fenilalanina, quando a planta foi exposta a concentrações de 1 a 10 μM de glyphosate, e um decréscimo no teor quando a planta foi submetida a concentrações superiores a 50 μM de glyphosate, sendo que a tirosina possui também uma tendência semelhante, onde um aumento no teor desses aminoácidos é observado em baixas exposições ao glyphosate (1 a 10 μM) seguido por uma redução, em exposição a maiores concentrações do herbicida (20 a 50 μM). Para o triptofano foi observada uma tendência de aumento, ao invés do esperado, que seria a redução (Petersen et al., 2007). Uma possível explicação seria que o triptofano é o aminoácido aromático menos sensível à inibição pelo glyphosate, em parte devido a diferenças na atividade da enzima pelo corismato (Amrhein et al., 1980).

Forlani et al. (2000), analisaram o conteúdo de aminoácidos em células de *Nicotiana plumbaginifolia* quatro dias após a adição de 100 μM de glyphosate em meio de cultura e verificaram redução na concentração de tirosina e fenilalanina, 59% e 77%, respectivamente, enquanto que o teor de triptofano reduziu somente 13%. Wang et al. (2001) investigaram o efeito do glyphosate no teor de aminoácidos aromáticos em plântulas de *Cyperus rotundus* e observaram que as concentrações de tirosina e fenilalanina, três dias após o tratamento, não diferiram significativamente da testemunha, e a concentração de triptofano foi significativamente maior em plântulas tratadas com glyphosate em comparação com a testemunha.

Velini et al. (2009) afirma que nem sempre é possível concluir que produtos distantes do sítio de ação do glyphosate (EPSPs) terão sua síntese bloqueada ou intensamente reduzida pela aplicação do herbicida, em função da presença de sistemas de controle da rota que podem compensar, ao menos em parte, a menor síntese de alguns dos compostos intermediários, portanto, quanto menor o número de reações que separam um determinado composto de interesse até o sítio de ação, maior a probabilidade de que as concentrações do mesmo sejam reduzidas como resultado da aplicação do herbicida.

Alterações na atividade da enzima EPSPs e de outras enzimas envolvidas na produção de aminoácidos aromáticos e compostos fenólicos podem alterar, de modo significativo, as concentrações do IAA, um importante regulador vegetal. Dentre as suas várias funções nas plantas, o IAA é fundamental para a elongação celular, a dominância apical, o crescimento de caules e raízes (principalmente em termos de profundidade) e sistema vascular (Taiz e Zeiger, 2009). De acordo com Velini et al. (2009) a interferência na síntese de AIA ocorre quando se realiza a aplicação do glyphosate como maturador em cana-de-açúcar, com quebra da dominância apical (morte ou não da gema apical) e brotação das gemas laterais.

O conjunto de compostos fenólicos pode ter efeitos importantes na absorção de luz, interferindo no processo fotossintético ou protegendo as plantas contra os efeitos da radiação ultravioleta. Gitz et al. (2004) observaram que os compostos fenólicos têm uma importante função como filtros de luz, com comprimentos de onda correspondentes ao UV-B.

Os taninos são compostos polifenólicos com capacidade de afetar o crescimento de insetos e outros animais herbívoros, além de microorganismos, através da precipitação de enzimas e proteínas (Polya et al., 1995; Kawamoto et al., 1996; Mila et al., 1996; Salminen et al., 2001; Hartzfeld et al., 2002; Salminen et al., 2002; Taiz e Zeiger, 2009). Os taninos condensados ou pró antocianidinas são formados pela polimerização de unidades de flavonóides. Já os taninos hidrolisáveis derivam do ácido gálico, correspondendo a polímeros de ácidos fenólicos e açúcares simples. A análise da síntese de taninos indica a dificuldade em inferir sobre o controle de rotas metabólicas em plantas. O bloqueio da enzima EPSPs resulta na acumulação de ácido chiquímico, um precursor dos taninos hidrolisáveis e reduz a disponibilidade de fenilalanina, precursor dos taninos condensados. Portanto, não há

como generalizar conclusões sobre efeitos do glyphosate para os taninos em geral. As duas sub-classes de compostos (hidrolisáveis e condensados) têm que ser tratadas separadamente (Velini et al., 2009).

A síntese de antocianinas, flavonóides e isoflavonóides também está relacionada a esta rota. As antocianinas estão envolvidas na expressão de um grande número de cores importantes na relação com animais (incluindo insetos) benéficos ou prejudiciais às plantas. Os flavonóides são importantes para filtrar e evitar danos provocados por luz ultravioleta. Os isoflavonóides são compostos frequentemente encontrados em leguminosas e com importantes funções na proteção contra insetos e patógenos (Velini et al., 2009).

A lignina é uma molécula fenólica altamente complexa e que só é menos abundante em plantas do que a celulose. A estrutura da lignina ainda não é completamente conhecida, mas sua presença é fundamental para a rigidez das células e tecidos, interferindo na qualidade da madeira e na resistência a estresses bióticos e abióticos (Raes et al., 2003; Taiz e Zeiger, 2009; Cabané et al., 2004).

O ácido salicílico é outro composto fenólico de grande relevância. Tem sido bastante discutida a relação do glyphosate com a síntese deste composto, em função do mesmo induzir a resistência a patógenos. O ácido salicílico é o principal composto sinalizador envolvido no acionamento de genes de resistência a patógenos biotróficos. Quanto à sua síntese, predominam as informações indicando a via fenilalanina→ácido transcinâmico→ácido benzóico→ácido salicílico como a única ou predominante em plantas (Ward et al., 1991; Ryals et al., 1996; Popova et al., 1997; Buchanan et al., 2000; Gaille et al., 2002; Ruuhola e Julkinen-Titto, 2003; Shah, 2003). Contudo, trabalhos recentes têm indicado também, a via corismato→isocorismato→ácido salicílico, com a participação da enzima isocorismato sintase (Tegelen et al., 1999; Shah, 2003; Wildermuth et al., 2001). Segundo Velini et al. (2009), a relação do glyphosate com a ocorrência de doenças com a síntese do ácido salicílico e fitoalexinas não é simples e demanda muito mais informações do que as disponíveis para ser compreendida.

Foram citados exemplos de compostos e processos que podem estar associados à rota do ácido chiquímico com o objetivo de evidenciar a importância desta rota, em termos de crescimento e desenvolvimento vegetal. O bloqueio dos passos iniciais da rota pode modificar a produção de vários compostos fundamentais para a continuidade da vida das

plantas. Os intrincados sistemas de controle da rota, fundamentados nas concentrações de substratos e produtos de cada reação, podem direcionar à rota ainda mais carbono do que os cerca de 20% normalmente verificados em plantas na ausência do herbicida (Boudet et al., 1985). Shultz et al. (1990) verificaram que após o tratamento com glyphosate, apenas o chiquimato e o chiquimato-3-fosfato podem representar até 16% do peso seco dos tecidos que atuam como drenos de fotoassimilados.

Os eventos pós inibição da EPSPs pelo glyphosate, que levam as plantas à morte, não estão claramente estabelecidos. A sua ação resulta da inibição da rota do ácido chiquímico, mas não está correto dizer que o seu efeito decorre apenas do bloqueio da síntese dos aminoácidos aromáticos. Em geral, a suplementação com estes três aminoácidos não é suficiente para reverter os efeitos do glyphosate. A morte das plantas deve ser associada aos três efeitos mencionados: a falha na produção de um vasto conjunto de compostos que derivam da rota; ao desregulamento do fluxo de carbono e à redução da síntese protéica em função da redução das concentrações dos aminoácidos aromáticos (Velini et al., 2009).

Alguns autores observaram que a aplicação do glyphosate em baixas doses, pode estimular o crescimento de plantas (Schanbenberger et al., 1999; Wagner et al., 2003; Cedergreen et al., 2007; Godoy, 2007; Carbonari et al., 2007a; Carbonari et al., 2007b; Velini et al., 2008). O estímulo de crescimento de uma planta por baixas doses de um composto tóxico é denominado “hormesis”, e indicam um comportamento que provavelmente não é único, mas é pouco freqüente entre os herbicidas. Os trabalhos citados mostram que a faixa de doses em que o glyphosate não atua em plantas é bastante estreita podendo ser de apenas 0 a 1,8 g e.a. ha⁻¹, em algumas espécies. Acima desta dose há uma segunda faixa de doses em que podem ocorrer estímulos de crescimento. Em uma terceira faixa de doses (em geral acima de 7,2 a 36 g e.a. ha⁻¹) é que verificam-se os efeitos inibitórios sobre plantas.

Não está claro como ocorre a regulação da rota do ácido chiquímico, afetada pela aplicação do glyphosate nas plantas, e se os sistemas de controle nas várias espécies de plantas e microorganismos são similares, no entanto, as poucas informações disponíveis indicam que não (Velini et al., 2009). Na Figura 5 está descrita a rota simplificada de formação dos aminoácidos aromáticos e compostos fenólicos a partir da via do ácido chiquímico.

4.4.3 Metabolismo do glyphosate pelas plantas

O glyphosate apresenta degradação relativamente rápida no solo por processos microbianos (Franz et al., 1997; Laitinen et al., 2006). O produto da degradação do herbicida no solo e na água mais frequentemente encontrado é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), como descrito anteriormente. Pouco se sabe sobre a(s) enzima(s) envolvidas na degradação do glyphosate a AMPA em plantas (Reddy et al., 2008). Suspeita-se que o glyphosate pode ser metabolizado pelas plantas por duas rotas semelhantes presentes em microorganismos (Franz et al., 1997). Uma delas envolve a clivagem da ligação C-N para produzir AMPA e a outra é a quebra da ligação C-P pela enzima C-Piase para gerar a sarcosina. O AMPA é fitotóxico a algumas espécies de plantas, embora ele seja consideravelmente menos ativo do que o glyphosate (Franz et al., 1997; Hoagland, 1980). Embora o glyphosate seja minimamente metabolizado pelas plantas (Duke, 1988), o AMPA foi encontrado como metabólito principal em sementes de canola (Cessna et al., 2000), em trigo (*Triticum aestivum* L.) (Cessna et al., 1994), em campos de ervilha (*Pisum sativum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), linhaça (*Linum usitatissimum* L.) (Cessna et al., 2002), e soja resistente ao glyphosate tratadas com o herbicida (Duke et al., 2003). O AMPA também foi encontrado na folhagem de *Agropyrum cristatum* (L.) Gaertn. (Cessna et al., 1995). Resíduos de AMPA também foram detectados em folhas e sementes de soja resistente ao glyphosate, tratada com o herbicida na dose recomendada, indicando o metabolismo do glyphosate na soja transgênica (Arregui et al., 2003).

A detecção do AMPA em folhas, raízes e sementes de várias culturas, inclusive a soja transgênica (resistente ao glyphosate), após a aplicação do glyphosate, sugere que a glyphosate oxidoreductase (GOX) ou um tipo de enzima semelhante, catalisa esta conversão (Reddy et al., 2008). O AMPA é tóxico a plantas de soja, embora menos do que o glyphosate; este modo de ação é aparentemente diferente do glyphosate, pois tanto a soja transgênica, como a convencional são igualmente sensíveis ao AMPA (Reddy et al., 2004). Algumas espécies de leguminosas são mais resistentes ao glyphosate do que outras, sendo que o baixo nível de resistência pode ser devido a diferenças na atividade da GOX (rápida detoxificação do glyphosate) (Reddy et al., 2004).

Como estratégia de desintoxicação, o gene *gox* foi isolado de *Ochrobactrum anthropi*, cepa LBAA (Hallas et al., 1988). Este gene *gox* codifica a enzima GOX, que tem a capacidade de degradar o glyphosate a glioxilato e AMPA (Barry et al., 1992). Como resultado, a GOX catalisa o metabolismo do glyphosate, reduzindo o montante de glyphosate que pode atingir a enzima alvo EPSPs, e portanto, reduzir a possibilidade de injúria na planta pelo glyphosate (Tan et al., 2006). A GOX tem sido empregada na combinação com a EPSPs insensível ao glyphosate, pois o mecanismo de desintoxicação sozinho não é suficiente para conferir resistência a doses comerciais do glyphosate (Dill, 2005).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Experimentos em casa-de-vegetação

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação, no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), pertencente à Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP campus de Botucatu/SP, durante os meses de agosto a dezembro de 2010. Foram realizados dois experimentos, o primeiro com o objetivo de quantificar compostos alterados nas plantas de milho após a aplicação do glyphosate e fosfito, e o segundo, avaliar visualmente os níveis de intoxicação das plantas, alterações na fotossíntese e acúmulo de matéria seca, ambos após a aplicação dos mesmos tratamentos.

O milho utilizado nos experimentos foi o híbrido simples Pioneer 30F53, cultivado em vasos contendo 5 litros do substrato Bioplant (material orgânico de origem vegetal e vermiculita expandida) com pH 5,7 ($\pm 0,5$), previamente adubado com 04-14-08 para que o desenvolvimento das plantas não fosse limitado pela deficiência nutricional. O plantio do milho foi realizado no dia 25 de agosto de 2010, onde foram semeadas 6 sementes por vaso. Aos 14 dias após a semeadura, foi realizado o desbaste das plantas, com o objetivo de se obter vasos com duas plantas de milho.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos testados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos utilizados nos experimentos. Botucatu/SP, 2010.

	Produto	Dose
1	glyphosate	72 g e.a. ha ⁻¹
2	glyphosate + fosfito de potássio	72 g e.a. ha ⁻¹ + 3 L p.c. ha ⁻¹
3	glyphosate	720 g e.a. ha ⁻¹
4	glyphosate + fosfito de potássio	720 g e.a. ha ⁻¹ + 3 L p.c. ha ⁻¹
5	fosfito de potássio	3 L p.c. ha ⁻¹
6	Testemunha	-----

No momento em que as plantas encontravam-se com sete folhas totalmente expandidas (estádio V7), aos 57 dias após a semeadura, foi realizada a aplicação dos tratamentos. Para pulverização dos tratamentos descritos na Tabela 1 foi utilizado um pulverizador estacionário (Figura 6), pertencente ao NUPAM, constituído por estrutura metálica (barra de pulverização), com 2,0 metros de largura, que desloca-se por uma área útil de 6,0 m² no sentido do seu comprimento. A barra é tracionada por um conjunto de motor elétrico e modulador de frequência, tornando possível o controle da velocidade de trabalho da barra. A barra foi equipada com quatro pontas XR 11002 VS, espaçadas em 0,5 m entre si, e dispostas a 0,5 m de altura em relação às plantas de milho. A pressão de trabalho utilizada pelo equipamento foi de 2,0 kgf cm⁻², com velocidade de 3,6 km h⁻¹ e consumo de calda de 200 L ha⁻¹. Os produtos comerciais utilizados para o preparo das caldas de pulverização foram o Roundup Original (360 g e.a. L⁻¹) e o fosfito de potássio Fosway, com 30% de P₂O₅ e 20% de K₂O.

**Figura 6.** Pulverizador estacionário utilizado e parcelas experimentais. Botucatu/SP, 2010.

No primeiro experimento, foram realizadas cinco coletas das plantas de milho, aos 2, 4, 6, 10 e 15 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA). O momento das coletas foi padronizado no período da tarde, pois os níveis dos compostos nas plantas podem sofrer alterações no decorrer do dia, como observado em testes preliminares. Para cada período de coleta, foram cortadas todas as folhas de quatro plantas por tratamento (repetições), conforme Figura 7.



Figura 7. Esquema de coleta das folhas de cada planta (A e B); colmo após a coleta das folhas (C); e acondicionamento das folhas em saco de papel (D). Botucatu/SP, 2010.

As folhas das plantas coletadas foram lavadas duas vezes com três litros de água em um recipiente plástico (Figura 8), para total remoção dos resíduos do glyphosate e fosfito, que permaneceram sobre a cutícula das folhas de milho. Após a lavagem, as folhas foram acondicionadas em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar, a 45°C (para que não ocorresse a degradação dos compostos), por um período de 72 horas, até que o material vegetal estivesse totalmente seco.



Figura 8. Esquema de lavagem das folhas de milho. Botucatu/SP, 2010.

Após a secagem das amostras, as mesmas foram moídas em moinho de rotor vertical com facas móveis e fixas (Marconi MA-340) com velocidade fixa de 1750 rpm e peneira de 10 mesh e acondicionadas em sacos de papel para posterior extração e análise dos compostos (Figura 9).



Figura 9. Moinho Marconi (MA-340) utilizado para moer as amostras (A); material vegetal sendo colocado no funil de adição de amostras (B); amostra moída sendo coletada (C). Botucatu/SP, 2010.

No segundo experimento, as plantas foram submetidas aos mesmos tratamentos já citados. Foram realizadas avaliações do fluxo de transporte de elétrons (ETR) no fotossistema II após uma hora da aplicação dos tratamentos, e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 15 DAA. O aparelho utilizado nessa avaliação foi um fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS5p – Opti Sciences), com leituras realizadas em seis pontos de

duas folhas por planta, uma folha madura e uma jovem, e o protocolo utilizado foi oYield (Figura 10).



Figura 10. Detalhe da leitura do ETR em folhas de milho, com o fluorômetro portátil (OS5p). Botucatu/SP, 2010.

Foram também realizadas avaliações visuais de intoxicação das mesmas plantas aos 2, 4, 6, 10 e 15 DAA, segundo escala percentual de notas, onde “0” corresponde a nenhuma injúria e “100” significa a morte das plantas, conforme Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995). No final do experimento, foi realizada a medida da altura das plantas, do solo até a inserção da última folha totalmente expandida. As folhas e o colmo de cada uma das plantas foram coletados e acondicionados em sacos de papel, e secos em estufa de circulação forçada de ar a 60°C, durante sete dias. Posteriormente, o material seco foi pesado em balança de precisão (0,001g) para determinação da biomassa em cada um dos tratamentos.

5.2 Metodologia analítica dos compostos

Para garantir que um novo método analítico seja capaz de gerar informações confiáveis e interpretáveis, ele deve ser submetido a uma série de estudos experimentais denominados validação. Os parâmetros geralmente envolvidos no procedimento de validação de um método analítico são: curva analítica, linearidade, limite de detecção e

quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (Sanco, 2007; Ribani et al., 2007; Lanças, 2004). O método analítico desenvolvido no Laboratório de Cromatografia do NUPAM mostrou-se eficiente para quantificação dos seguintes compostos: glyphosate, ácido chiquímico (ou chiquimato), ácido quínico, ácido aminometilfosfônico (AMPA), ácido desidrochiquímico, e para os três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. Os padrões analíticos dos compostos testados apresentaram grau de pureza superior a 98%.

Para a realização das análises foi utilizado um sistema LC-MS/MS (Figura 11), composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, que combina análise *ultra-rápida* e excelente performance de separação, com alta confiabilidade de resultados; equipado com duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 3200 Q TRAP (Applied Biosystems), híbrido triplo quadrupolo, onde Q1 e Q3 são utilizados como filtros de massa e Q2 é uma célula de colisão onde as moléculas intactas e fragmentos de Q1 são quebrados em fragmentos de massas menores.

O modo utilizado nas análises foi o triplo quadrupolo, sendo que Q3 é definido para detectar apenas uma massa especial, que é um fragmento conhecido (filho) da molécula intacta (pai) de massa conhecida filtrada por Q1. Este é o modo quantitativo padrão utilizado para metabólito alvo, tendo como principais vantagens alta sensibilidade e reprodutibilidade, baixo ruído e medição simultânea de até 100 compostos (Queiroga, 2009).



Figura 11. Cromatógrafo Líquido (Proeminence UFLC) acoplado ao espectrômetro de massas (3200 Q TRAP) – LC-MS/MS. Botucatu/SP, 2010.

Para otimizar as condições do espectrômetro de massas foram realizadas infusões, ou seja, injeções diretas no espectrômetro de massas, com solução analítica padrão de 1 mg L^{-1} de cada composto individualmente. A partir das infusões, foi escolhido o modo de ionização da fonte (ESI – Ionização por eletrospray), que produz íons do analito na fase líquida antes de entrarem no espectrômetro de massas. O modo de ionização negativo foi utilizado para os seguintes compostos: ácido chiquímico, ácido quínico, ácido desidrochiquímico, glyphosate e AMPA. Para os três aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), foi utilizado o modo de ionização positivo.

As condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização negativo e positivo estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização negativo. Botucatu/SP, 2010.

Coluna Analítica	Gemini 5 μ C18 110 Å (150mm x 4,6mm)
Fase móvel	Fase A (FA) = 5 mM acetato de amônio em água Fase B (FB) = 5 mM acetato de amônio em metanol
Gradiente	0 – 1 minuto = 30%FB e 70% FA 1 – 2,5 minutos = 50% FB e 50%FA 2,5 – 5 minutos = 50% FB e 50% FA 5 – 6,5 minutos = 75%FB e 25% FA 6,5 – 8,5 minutos = 75%FB e 25% FA 8,5 – 10 minutos = 90% FB e 10% FA 10 – 15 minutos = 90% FB e 10% FA 15 – 18 minutos = 30% FB e 70% FA
Fluxo	0,500 ml min ⁻¹

Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização positivo. Botucatu/SP, 2010.

Coluna Analítica	Synergi 2,5 μ Fusion RP 110 Å
Fase móvel	Fase A (FA) = 5 mM acetato de amônio em água Fase B (FB) = 5 mM acetato de amônio em metanol
Gradiente	0 – 2 minutos = 10%FB e 90% FA 2 – 4 minutos = 40% FB e 60%FA 4 – 9 minutos = 95% FB e 5% FA 9 – 12 minutos = 95%FB e 5% FA 12 – 15 minutos = 10%FB e 90% FA 8,5 – 10 minutos = 90% FB e 10% FA 10 – 15 minutos = 90% FB e 10% FA
Fluxo	0,250 ml min ⁻¹

Para uma identificação inequívoca que permita a quantificação do composto, é necessário monitorar mais do que um íon. A utilização do LC-MS/MS possibilita

o controle do íon molecular e de transições iônicas provenientes da fragmentação do mesmo, garantindo a sensibilidade e a especificidade necessárias para a quantificação dos analitos, em concentrações, por vezes vestigiais, presentes em matrizes de elevada complexidade (Queiroga, 2009). A massa molecular e os fragmentos gerados a partir de cada molécula estão apresentados na Tabela 4. O fragmento utilizado para quantificação de cada um dos compostos foi sempre o primeiro apresentado na Tabela 4, para cada composto.

A detecção e separação dos compostos foram realizadas em duas corridas, uma para o modo negativo (18 minutos), e outra para o modo positivo (15 minutos). Cada composto possui um tempo de retenção na coluna cromatográfica, sendo eles: ácido chiquímico (3,301 minutos); ácido quínico (3,256 minutos); ácido desidrochiquímico (3,311 minutos); glyphosate (3,102 minutos), AMPA (3,219 minutos); fenilalanina (0,917 minutos); tirosina (0,799 minuto); e triptofano (1,006 minutos). As Figuras 12 a 14 apresentam exemplos de cromatogramas de padrões analíticos ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) de alguns compostos, nas condições descritas anteriormente.

Tabela 4. Massa molecular e íons secundários dos compostos analisados. Botucatu/SP, 2010.

Composto	Massa Molecular	Íons Secundários (Fragmentos)
Ácido chiquímico	174,15	93.000
		111.000
Ácido quínico	192,17	84.900
		93.900
		59.100
Ácido desidrochiquímico	172,14	126.900
		109.000
		126.400
Glyphosate	169,08	63.100
		150.000
		78.900
AMPA	111,04	62.900
		78.900
		80.800
Fenilalanina	165,19	120.100
		103.100
		77.100
Tirosina	181,19	91.100
		136.100
		123.100
Tryptofano	204,23	188.200
		146.100
		118.100

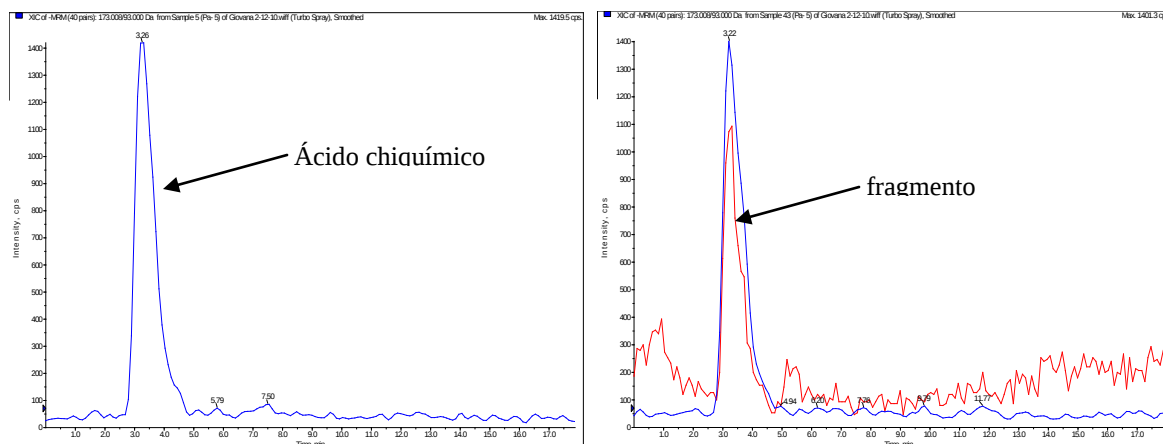


Figura 12. Cromatogramas do ácido chiquímico e o fragmento gerado na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Botucatu/SP, 2010.

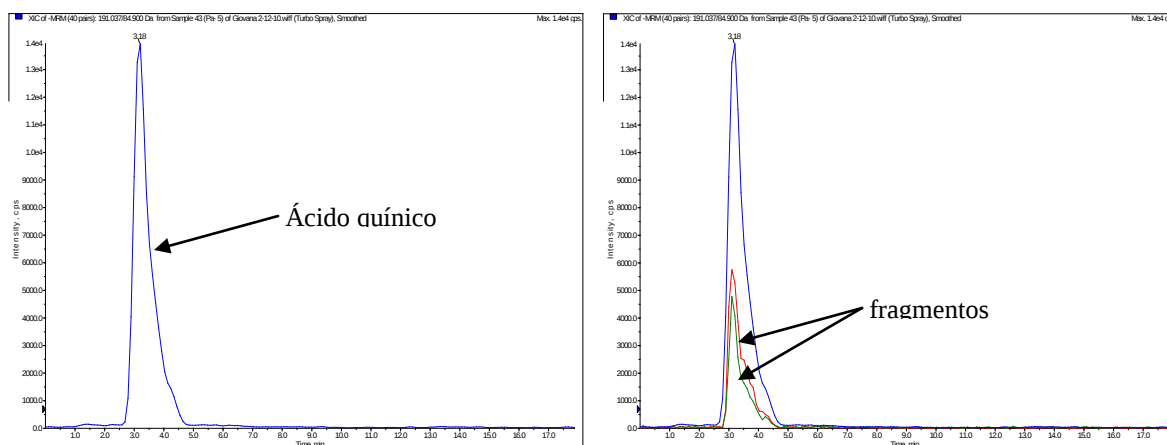


Figura 13. Cromatogramas do ácido quínico e os fragmentos gerados na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Botucatu/SP, 2010.

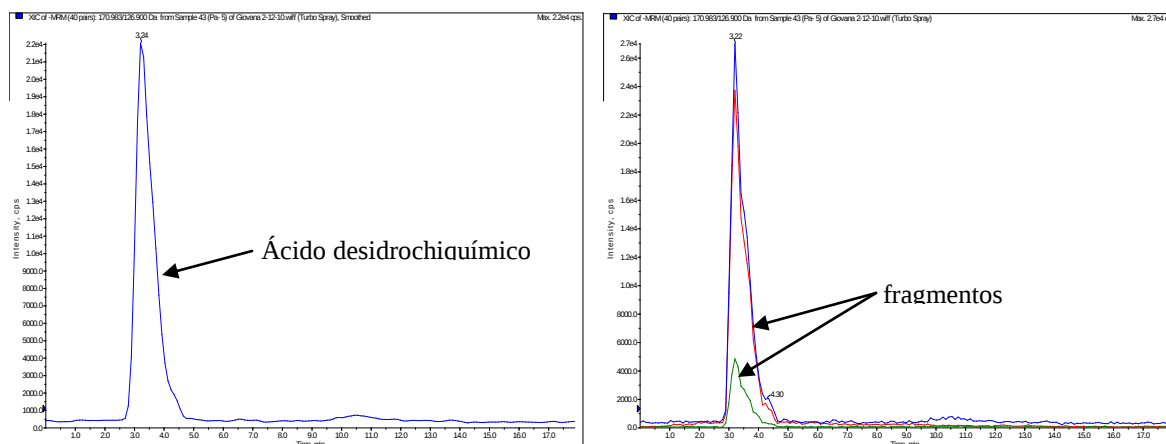


Figura 14. Cromatogramas do ácido desidrochiquímico e os fragmentos gerados na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Botucatu/SP, 2010.

A curva analítica é a ferramenta de quantificação mais frequentemente utilizada e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo (Feinberg, 2007). Segundo Gonçalves (2007), para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do analito em estudo, podendo ser representada pela equação da regressão linear descrita abaixo, que deve também ter um alto coeficiente de correlação ($r > 0,9999$).

$$y = ax + b$$

Onde b é a intersecção da curva analítica e a é a inclinação da reta. As curvas analíticas para os compostos foram construídas nas faixas de concentração descritas na Tabela 5. O modelo linear utilizado nas equações mostrou-se bastante adequado.

Tabela 5. Curvas analíticas e faixas de concentração para cada composto analisado. Botucatu/SP, 2010.

Composto	Equação da reta ($y=ax+b$)	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ácido chiquímico	$y=218x+3,23.10^3$	0,9972	50-3200
Ácido quínico	$y=3,65.10^3x+456$	0,9846	25-400
Ácido desidrochiquímico	$y=2,67.10^3x+2,74.10^4$	0,9619	25-400
Glyphosate	$y=429x+2,3.10^4$	0,9924	25-3200
AMPA	$y=80x+1,64.10^3$	0,9860	25-3200
Fenilalanina	$y=529x+8,39.10^3$	0,9992	20-1250
Tirosina	$y=117x+1,46.10^3$	0,9958	20-1250
Triptofano	$y=176x+971$	0,9926	20-350

5.3 Extração dos compostos

Para desenvolver o método de extração dos compostos da amostra, foi realizado um teste, com híbridos de milho Pioneer 30F53, cultivado nas mesmas condições descritas anteriormente para o experimento. As plantas de milho foram submetidas à aplicação do herbicida glyphosate na dose de 720 g e.a. ha^{-1} , no pulverizador já descrito. Um dia após a aplicação (DAA) foi realizada a coleta das plantas. Metade do material coletado foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 45°C, durante 72 horas, e a outra metade foi congelada fresca, em freezer a -80°C. Após 72 horas, as amostras secas foram moídas em moinho, e as frescas, em almofariz com nitrogênio líquido.

Após as amostras serem moídas, pesou-se cerca de 100 mg da amostra seca e 200 mg da amostra fresca em balança Shimadzu (AY220) com 0,0001g de precisão, que foram acondicionadas em tubos “falcon” de 15 mL de capacidade. Foram realizados testes de extração para ambos os tipos de amostra (fresca e seca), as quais estão apresentadas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Metodologias de extração dos compostos a partir do material vegetal fresco.
Botucatu/SP, 2010.

	Extrações
1	10 mL de metanol e água (1:1) + homogeneização em turrax por 5 minutos
2	10 mL de água destilada a 60°C + homogeneização em turrax por 5 minutos
3	10 mL de água (pH 2,5) + homogeneização em turrax por 5 minutos
4	10 mL de água destilada + homogeneização em turrax por 5 minutos

Tabela 7. Metodologias de extração dos compostos a partir do material vegetal seco.
Botucatu/SP, 2010.

	Extrações
1	10 mL de metanol e água (1:1) + 30 minutos de banho de ultrassom
2	10 mL de água (pH 2,5) + 30 minutos de banho de ultrassom
3	10 mL de água destilada a 60°C + 30 minutos de banho de ultrassom
4	10 mL de água destilada + 30 minutos de banho de ultrassom

Após a realização dos métodos de extração dos compostos, todas as amostras foram submetidas à centrifugação a 4000 rpm, durante 10 minutos a 20°C (centrífuga Rotanta 460R). O sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro Millex HV (Millipore) 0,45 µm, com membrana durapore 13 mm, e acondicionados em vial âmbar 9mm (Flow Supply), com 2 mL de capacidade, para posterior quantificação por LC-MS/MS.

Com base nos resultados obtidos no teste de extração dos compostos, foi selecionado o segundo a partir da matéria seca (Tabela 7) como método de extração padrão para todas as amostras do experimento descrito no primeiro item.

Após as amostras passarem pelos processos de secagem e moagem, foi realizada a pesagem de cerca de 100 mg da mesma e acondicionada em tubo “falcon” com 15 mL de capacidade. Foi adicionado no tubo contendo a amostra, 10 mL de água acidificada a

pH 2,5, com pipeta automática Gilson. Os tubos foram agitados para que a amostra seca fosse misturada com a água.

Os tubos foram submetidos a banho de ultra-som (Cristófoli Biossegurança) com frequência ultra-sônica de 42 KHz, durante 30 minutos. Na sequência, foram centrifugados e o sobrenadante coletado, filtrado e acondicionado em vial, como já descrito. Na Figura 15 estão apresentados os passos da metodologia de extração utilizada.

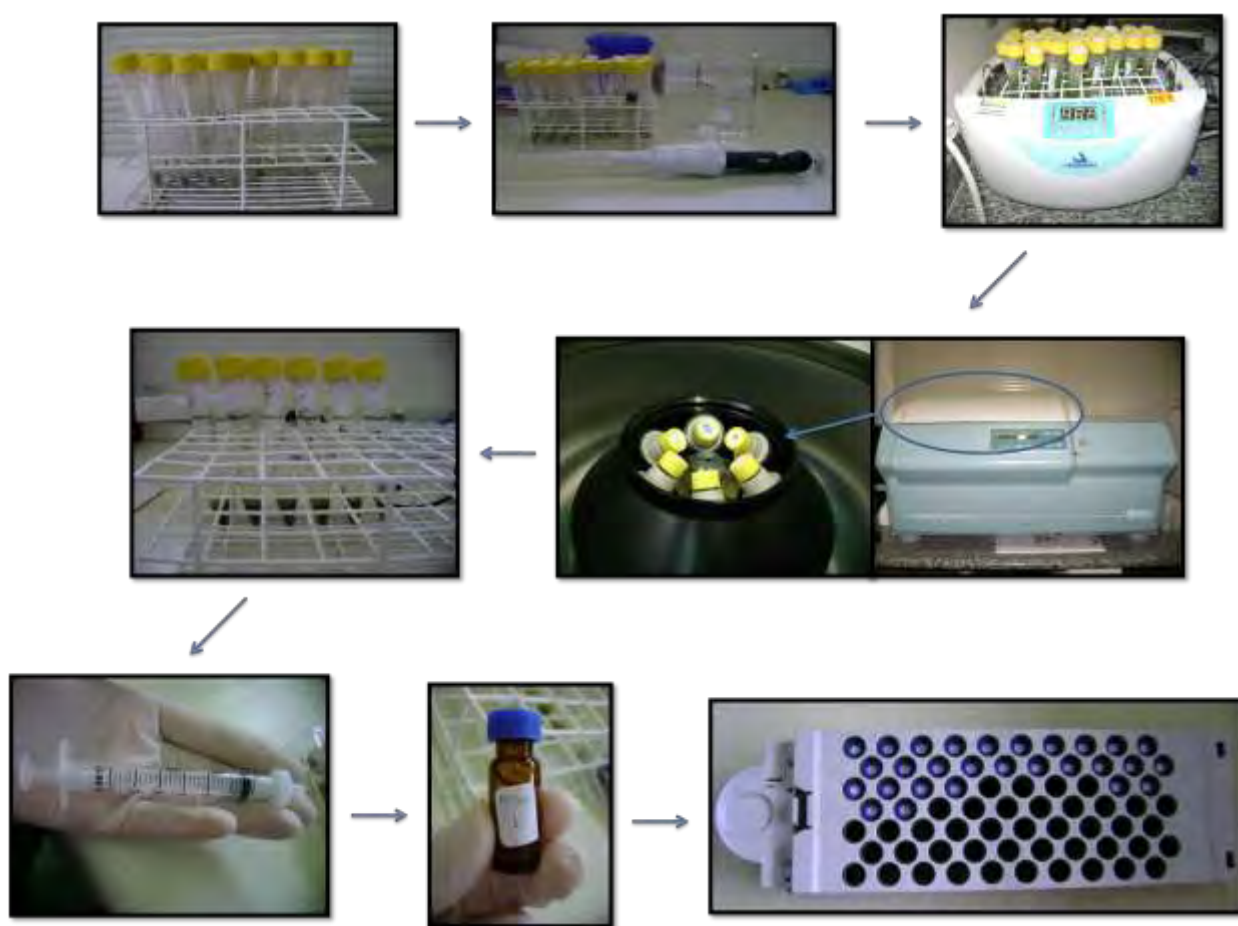


Figura 15. Sequência do processo de extração dos compostos a partir das amostras secas. Botucatu/SP, 2010.

5.4 Análise dos Resultados

Para os resultados das concentrações dos compostos avaliados ($\mu\text{g g}^{-1}$) e taxa de transporte de elétrons (ETR) nos diferentes períodos, foi estabelecido o intervalo de confiança pelo teste t a 10% de probabilidade. Para determinar o intervalo de confiança, foi utilizada a seguinte equação:

$$IC = (t \times \text{desvpad}) / \text{raiz nr, onde:}$$

IC = intervalo de confiança;

t = valor de t tabelado, ao nível de 10% de probabilidade;

desvpad = desvio padrão;

raiz nr = raiz quadrada do número de repetições.

Foi realizada também uma análise de correlação entre os diferentes compostos avaliados. Os resultados de biomassa, altura e intoxicação das plantas de milho foram submetidos à análise de variância pelo teste “F” a 10% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste t a 10% de probabilidade.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Extrações dos compostos

Nas Figuras 16 e 17 estão apresentados os dados da concentração dos compostos avaliados no trabalho, em diferentes metodologias de extração, a partir do material vegetal fresco e seco, respectivamente. Para as extrações a partir da matéria fresca foi utilizado o turrax para homogeneização da amostra, rompimento das células e conseqüente extravasamento das substâncias para o solvente utilizado. Não foi utilizado o banho de ultrassom neste caso, pois o próprio turrax já possui esse sistema para romper as células. Independente do solvente e do procedimento adotado, a utilização da matéria fresca não se mostrou mais apropriada, pois o teor de água entre as amostras pode variar muito, sub ou superestimando os valores encontrados, além do teor de água da própria planta variar no decorrer do experimento devido à intoxicação da mesma pelo herbicida glyphosate. Os três aminoácidos aromáticos foram pouco extraídos a partir do material fresco, justificando também a não adoção deste método de extração (Figura 16).

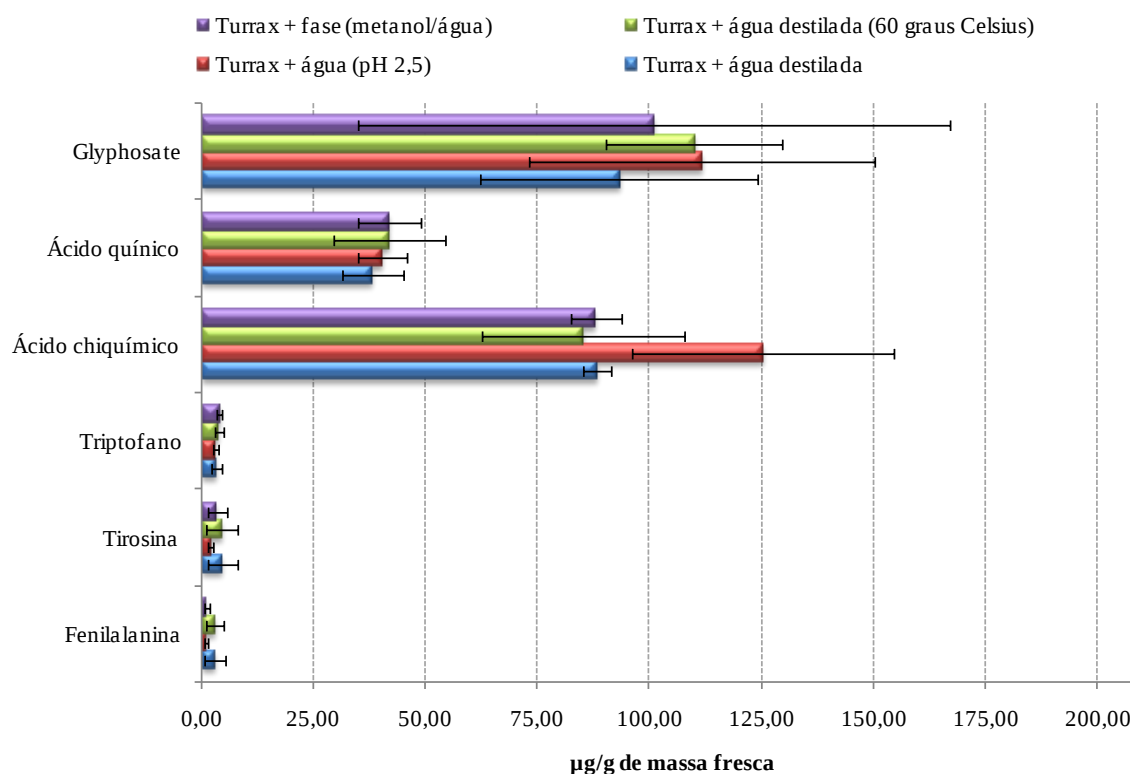


Figura 16. Concentração dos compostos ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa fresca de plantas de milho em diferentes extrações. Botucatu/SP, 2010. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

A extração dos compostos a partir das amostras previamente secas é largamente utilizada, pois se evita grandes variações experimentais (Rocha et al., 2006), mantendo as amostras uniformes, sem variações no teor de umidade, sendo assim, mais facilmente padronizadas. Em trabalho realizado por Matallo et al. (2009), a extração do ácido chiquímico foi realizada a partir de amostras secas e moídas, com adição de água acidificada (pH 2,5) e submetidas ao forno microondas. Assim como observado pelos autores, a extração com utilização de água acidificada foi adequada não só para o ácido chiquímico, mas também para os outros compostos testados, com modificações, sendo que as amostras não foram submetidas ao forno microondas, mas ao banho de ultrassom durante 30 minutos. Não foram testadas extrações com o auxílio do turrax para massa seca, pois a secagem das amostras e o banho de ultrassom já rompem as células do tecido vegetal.

Os compostos desidrochiquímico e AMPA não foram detectados nas amostras, pois as mesmas foram coletadas um dia após a aplicação do glyphosate e provavelmente não havendo o tempo necessário para o acúmulo desses compostos nas plantas.

Dessa forma, a extração dos compostos a partir da matéria seca, com a utilização de água acidificada e banho de ultrassom foi o procedimento adotado como padrão, uma vez que apresentou os melhores resultados para a extração dos aminoácidos aromáticos, tirosina, fenilalanina e triptofano, e resultados semelhantes às demais metodologias de extração para os outros compostos avaliados (Figura 17).

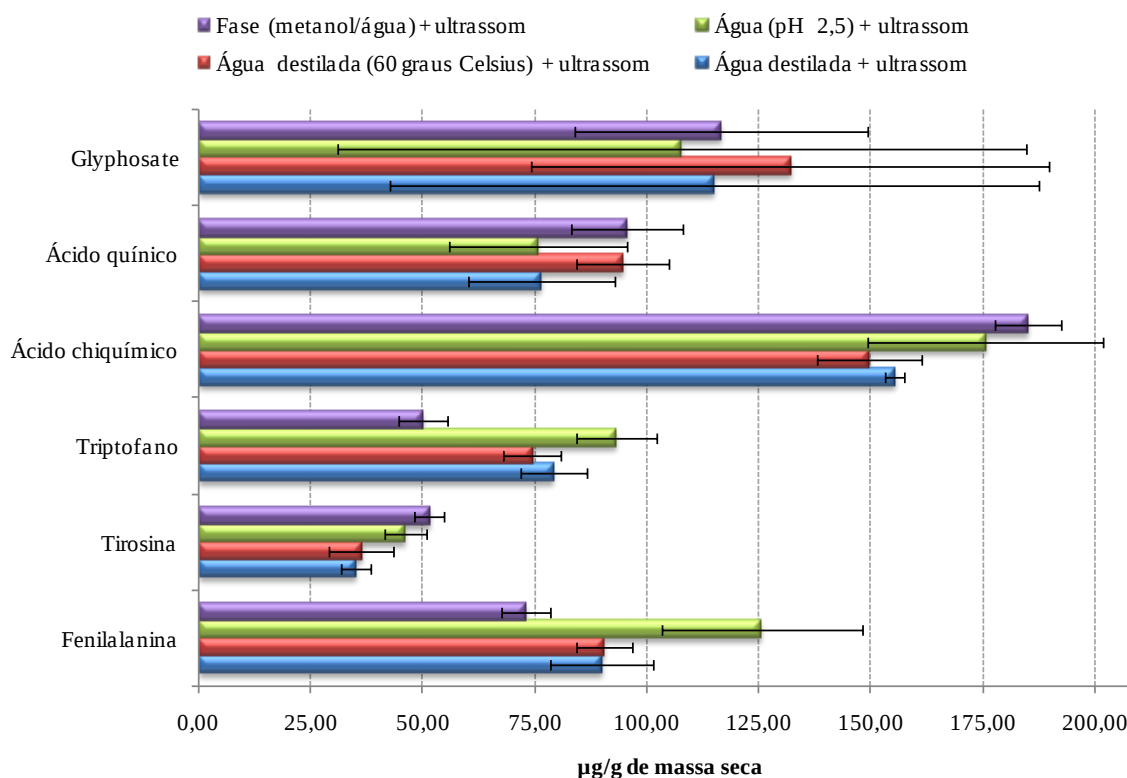


Figura 17. Concentração dos compostos ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa seca de plantas de milho em diferentes extrações. Botucatu/SP, 2010. Barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

6.2 Experimentos em casa-de-vegetação

Nas Tabelas 8 a 12 estão apresentados os dados referentes aos níveis dos compostos glyphosate, AMPA, ácido chiquímico, ácido quínico e ácido desidrochiquímico, encontrados nas plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito de potássio em associação ou isolados.

Foram detectados níveis de glyphosate no tecido das plantas de milho somente nos tratamentos com a dose de 720 g ha^{-1} , em associação ou não com o fosfito (Tabela 8). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de glyphosate entre as plantas nos tratamentos com e sem fosfito. Observa-se um decréscimo no nível de glyphosate nas plantas, com o aumento dos dias após a aplicação dos tratamentos, indicando uma possível degradação do produto na planta. Segundo Mannervik e Danielson (1988) existem enzimas com capacidade de metabolizar herbicidas nas plantas, sendo que uma das mais consideradas é a glutathione S-transferase (GST), que catalisa a conjugação de glutathione (GSH) a uma variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, geralmente citotóxicos, produzindo conjugados solúveis em água, reduzindo a toxicidade do produto (Cole, 1994; Kreuz et al., 1996). Cataneo et al. (2003) avaliaram o comportamento da GST como agente de degradação do herbicida glyphosate em milho, e concluíram que a enzima atua na degradação do glyphosate em plântulas de milho, quando aplicado em baixas concentrações.

Quando foi aplicada a dose de 72 g ha^{-1} de glyphosate, isolada ou associada com o fosfito, não foi detectado o herbicida no tecido das plantas (Tabela 8). Os níveis de glyphosate avaliados referem-se somente ao produto que a planta absorveu, ou seja, que está disponível para se ligar ao sítio de ação e bloquear a rota do ácido chiquímico, pois as folhas foram lavadas antes de serem submetidas à secagem, retirando-se o resíduo que estava sobre a cutícula das mesmas.

Os níveis de ácido aminometilfosfônico (AMPA) presentes nas folhas das plantas de milho estão apresentados na Tabela 9. Somente nas plantas que receberam a dose de 720 g ha^{-1} de glyphosate é que foi observada a presença de AMPA, que é o principal metabólito do glyphosate, mas ainda pouco se sabe sobre a degradação do glyphosate a AMPA em plantas.

Tabela 8. Níveis de glyphosate ($\mu\text{g g}^{-1}$) em plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados ou isolados.
Botucatu/SP, 2010.

Tratamentos	Períodos de Coleta				
	2 DAA	4 DAA	6 DAA	10 DAA	15 DAA
	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha verde
Testemunha	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
glyphosate (72 g ha ⁻¹)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
glyphosate (72 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
glyphosate (720 g ha ⁻¹)	21,5±8,0	5,6±0,5	6,8±1,1	3,2±0,7	5,2±2,09
glyphosate (720 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	13,6±2,3	7,7±3,5	4,9±2,0	7,3±7,2	7,3±4,1
fosfito (3 L ha ⁻¹)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.

Tabela 9. Níveis de ácido aminometilfosfônico (AMPA) ($\mu\text{g g}^{-1}$) em plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados ou isolados. Botucatu/SP, 2010.

Tratamentos	Períodos de Coleta					
	2 DAA	4 DAA	6 DAA	10 DAA	15 DAA	
	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha verde
Testemunha	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
glyphosate (72 g ha ⁻¹)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
glyphosate (72 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
glyphosate (720 g ha ⁻¹)	0,97±0,43	0,61±0,53	0,56±0,30	0,00±0,00	0,02±0,05	
glyphosate (720 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	0,70±0,50	0,76±0,67	0,33±0,13	0,78±0,17	0,12±0,11	
fosfito (3 L ha ⁻¹)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.

A detecção do AMPA em folhas, caules e sementes de várias culturas, incluindo a soja resistente ao glyphosate, após a aplicação do mesmo, sugere que a glyphosate oxidoreductase (GOX) ou um tipo de enzima similar, catalise esta reação. (Reddy et al., 2008; Reddy et al., 2004; Duke et al., 2003; Arregui et al., 2003). Reddy et al. (2004) detectaram 8 µg de AMPA por grama de tecido de soja resistente ao glyphosate, sete dias após a aplicação do mesmo em uma dose de 6,72 kg ha⁻¹.

Em trabalho realizado por Reddy et al. (2008), foram encontrados níveis diversos de glyphosate e AMPA em 11 espécies de plantas (milho e soja, resistentes e suscetíveis ao glyphosate, *Senna occidentalis*, *Vigna unguiculata*, *Sesbania exaltata*, *Conyza canadensis*, *Desmanthus illinoensis*, *Lolium perenne* L. ssp. *multiflorum*, *Pueraria lobata*, *Senna obtusifolia* e *Abutilon theophrasti*) com sensibilidade variável ao herbicida. O AMPA foi detectado em todas as espécies leguminosas, com exceção da *Sesbania exaltata*, e a concentração do metabólito nas plantas estudadas variou de 119 ng g⁻¹ nos tecidos de soja transgênica a 4675 ng g⁻¹ em *Vigna unguiculata*. Neste estudo não foi observada uma correlação entre glyphosate e AMPA, sugerindo que a GOX possa ser responsável por esta conversão. Outra rota possível de degradação do glyphosate a AMPA foi sugerida por Barret e McBride (2005), através de uma degradação oxidativa (abiótica) envolvendo a clivagem da ligação C-P e C-N na presença de óxido de manganês.

É possível também que os níveis de AMPA encontrados nas folhas de milho submetidas à maior dose de glyphosate testada, ocorram pela absorção do metabólito presente na superfície das folhas, decorrente da degradação microbiana do glyphosate, hipótese levantada por Reddy et al. (2008).

Na Figura 18 pode ser observada a correlação dos níveis de glyphosate e AMPA nos tecidos das plantas de milho. Verifica-se uma correlação relativamente baixa entre os níveis dos dois compostos, ou seja, nas amostras em que foram encontradas maiores concentrações do glyphosate, não necessariamente foram encontradas as maiores doses do seu principal metabólito, o AMPA.

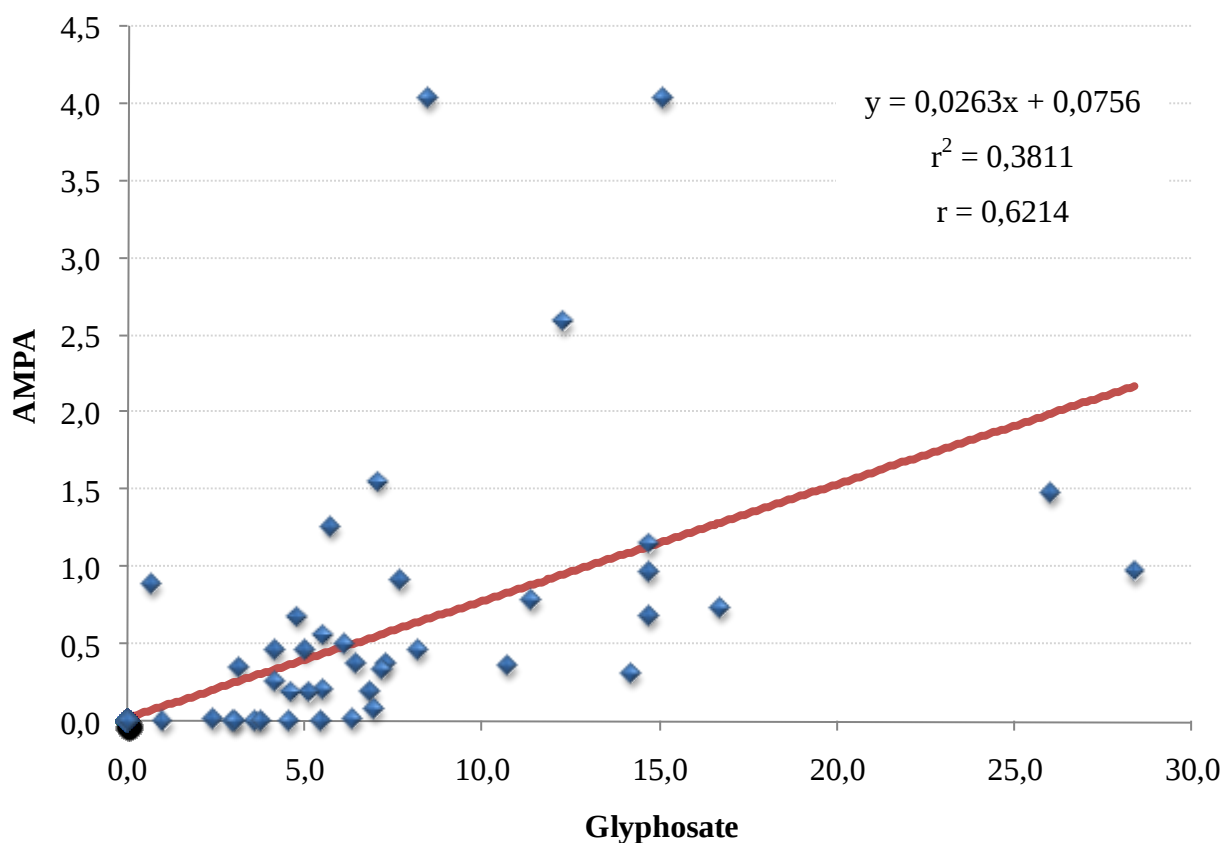


Figura 18. Correlação entre os níveis de glyphosate e AMPA nas folhas de milho. Botucatu/SP, 2010.

Na Tabela 10 estão apresentados os dados referentes à concentração de ácido chiquímico nas plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito. Os níveis de ácido chiquímico encontrados nas plantas testemunhas nos períodos avaliados variaram de 10 a 59 $\mu\text{g g}^{-1}$, e os tratamentos somente com glyphosate na dose de 72 g ha^{-1} e com fosfito isolado apresentaram valores semelhantes ao da testemunha, independente do período avaliado.

Tabela 10. Níveis de ácido chiquímico ($\mu\text{g g}^{-1}$) em plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados ou isolados. Botucatu/SP, 2010.

Tratamentos	Períodos de Coleta									
	2 DAA		4 DAA		6 DAA		10 DAA		15 DAA	
	Folha	verde	Folha	verde	Folha	verde	Folha	verde	Folha	verde
Testemunha	59,1±23,1		16,1±9,9		28,6±9,25		10±15,1		21,1±28,1	
glyphosate (72 g ha ⁻¹)	52,5±28,8		66,4±19,2		41,7±48,64		15,08±9		21,3±16,7	
glyphosate (72 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	163,3±106,35		256,3±129,3		129,3±44,7		28,4±20,5		39,4±17,6	
glyphosate (720 g ha ⁻¹)	1111±371,9		1285±125,5		1053,3±185,2		859,8±234,6		129±28,5	
glyphosate (720 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	1028,5±157,1		1197,5±260		672,3±89,1		1266,2±405,2		267,5±135,3	
fosfito (3 L ha ⁻¹)	37,9±18,6		19,6±19		30±14,9		16,4±6		13,6±11,2	

Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.

Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.

Os níveis de ácido chiquímico após a aplicação da dose de 72g ha^{-1} de glyphosate associada ao fosfito foram superiores ao da testemunha até os 6 DAA, com redução da concentração do composto nos tecidos aos 10 e 15 DAA, não diferindo estatisticamente da testemunha nesses períodos. A associação do fosfito com a menor dose do glyphosate causou maior acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos das plantas de milho em comparação com a mesma dose do herbicida aplicado isoladamente. Comportamento semelhante ao observado neste trabalho foi também obtido por Gravena et al. (2008), com a ocorrência de acúmulo de ácido chiquímico em folhas jovens e adultas de limão cravo após a aplicação do glyphosate, com altas concentrações logo aos 2 DAA, e posteriormente os valores decresceram, indicando um efeito transitório do herbicida.

Altos níveis de ácido chiquímico foram detectados em plantas de milho após a aplicação do glyphosate na dose de 720 g ha^{-1} isolado ou em associação com o fosfito de potássio. Para o glyphosate isolado observa-se uma leve queda nos níveis de ácido chiquímico a partir de 10 DAA e para o tratamento associado com o fosfito observa-se aumento da concentração do composto aos 10 e 15 DAA. Nas folhas cloróticas (com sintomas severos de intoxicação) foram observados níveis muito inferiores de ácido chiquímico em comparação com as folhas verdes da mesma planta, pois com a degradação da folha, possivelmente os compostos também foram degradados. Vários autores demonstraram que os níveis de ácido chiquímico após a aplicação do glyphosate podem mudar com o tempo, como tem sido observado em folhas jovens de *Abutilon theophrastii* (Becerril et al., 1989), em grãos de trigo (Bresnahan et al., 2003) e folhas de buva (Mueller et al., 2003).

Reddy et al. (2008) encontraram níveis de ácido chiquímico em onze espécies de plantas não tratadas com glyphosate que variaram de 2 a $904\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido. Nas mesmas plantas tratadas com o glyphosate foram observados altos níveis de chiquimato, com exceção da soja resistente ao glyphosate e do milho resistente e suscetível ao herbicida. Os valores variaram de $53\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ em soja resistente ao glyphosate a $16530\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ em tecidos de caupi. Nandula et al. (2007) testando o efeito do glyphosate no acúmulo de ácido chiquímico em folhas de três variedades de soja resistentes ao herbicida, verificaram que não houveram diferenças significativas nos níveis de chiquimato entre as variedades, com valores que variaram de 113 a $151\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido.

Com o bloqueio da enzima EPSPs pelo herbicida glyphosate, vários trabalhos demonstraram o aumento da concentração de ácido chiquímico em plantas de milho não resistentes ao glyphosate (Reddy et al., 2010), plântulas de *Brassica napus* (Petersen et al., 2007), folhas de ervilha (Orcaray, 2010), folhas de *B. decumbens* e cana-de-açúcar (Matallo et al., 2009) plantas de soja não resistentes ao glyphosate (Hernandez et al., 1999), folhas jovens e maduras de *Lupinus albus* (María et al., 2006). Os elevados níveis de ácido chiquímico são utilizados como um indicador precoce e altamente sensível dos efeitos do glyphosate nos tecidos das plantas (Harring et al., 1998). No entanto, Pline et al. (2002) e Singh e Shaner (1998) mostraram que plantas transgênicas resistentes ao glyphosate não acumulam grandes quantidades de ácido chiquímico após a aplicação do herbicida, desta forma não seria um indicador do efeito do herbicida nestas plantas.

Geiger et al. (1986) observaram que o acúmulo de ácido chiquímico em folhas adultas de *Beta vulgaris* L. iniciou rapidamente, atingindo uma concentração 80 vezes maior do que a testemunha, 24 horas após a aplicação. Fuchs et al. (2002) encontraram concentrações tão elevadas como $0,17 \text{ mg g}^{-1}$ de matéria fresca de *Abutilon theophrasti* após a aplicação do glyphosate. De maneira semelhante, Singh e Shaner (1998) observaram aumento da concentração de ácido chiquímico em folhas jovens de soja aproximadamente de 0,4 para $40 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca aos 8 DAA, e aumento de 0,4 para $12,8 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ em milho.

O comportamento do ácido quínico nas folhas de milho foi semelhante ao comportamento do ácido chiquímico, mas em menores proporções. Na Tabela 11 podem ser observados os níveis de ácido quínico nas plantas de milho após a aplicação de glyphosate e fosfito. As plantas submetidas à aplicação do fosfito de potássio isoladamente não apresentaram diferenças nos níveis de ácido quínico com relação à testemunha até os 6 DAA. Aos 10 e 15 DAA os níveis de ácido quínico nas plantas tratadas foi inferior ao da testemunha. O mesmo comportamento foi observado nas plantas submetidas à aplicação do glyphosate na dose de 72 g ha^{-1} , isolado e em associação com o fosfito.

Tabela 11. Níveis de ácido quínico ($\mu\text{g g}^{-1}$) em plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados ou isolados. Botucatu/SP, 2010.

Tratamentos	Períodos de Coleta							
	2 DAA	4 DAA	6 DAA	10 DAA	15 DAA			
	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha clorótica	Folha verde	Folha clorótica
Testemunha	43,4±9,5	12,5±3,1	25,8±4,4	27,3±18,5	-	51,7±37,7	-	-
glyphosate (72 g ha ⁻¹)	38,5±11,6	35±30,6	37,9±28,1	11,9±6	-	13,8±8,7	-	-
glyphosate (72 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	51,5±46,4	84±42,2	30,8±11,3	12,3±5,3	-	26,2±13,9	-	-
glyphosate (720 g ha ⁻¹)	199,8±90,5	334,5±44	325,5±62,8	237±66,9	34,7±12,3	304,3±162,4	50±9,8	
glyphosate (720 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	157±37,6	272,8±55,8	199,8±60,4	299,5±154,8	94,7±36,1	397±56,38	119,9±39,2	
fosfito (3 L ha ⁻¹)	33,2±9	17,1±6,6	34,7±4,9	9±2,9	-	13,5±6,1	-	-

Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.

Supostamente, o ácido quínico pode ser um composto reserva na via do ácido chiquímico, embora seu papel fisiológico não seja completamente esclarecido (Orcaray et al., 2010). Sabe-se que o ácido quínico é um composto que ocorre relativamente em altas concentrações em tecidos verdes e não verdes de plantas herbáceas (Yoshida et al., 1975), tecidos jovens de coníferas (Ossipov e Aleksandrova, 1982) e frutas (Albertini et al., 2006).

Para a maior dose de glyphosate testada, foi observado um aumento na concentração de ácido quínico nas folhas de milho de aproximadamente 4,6 vezes maior do que a testemunha aos 2 DAA. Aos 4 e 6 DAA houve aumento dos níveis de ácido quínico, com posterior decréscimo aos 10 e 15 DAA. Com relação à dose de 720g ha^{-1} de glyphosate em associação com o fosfito, houve um aumento gradual dos níveis de ácido quínico nos tecidos no decorrer dos períodos avaliados, com concentração de $397\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ aos 15 DAA. Assim como observado para o ácido chiquímico, o conteúdo de ácido quínico nas folhas cloróticas foi inferior ao encontrado nas folhas verdes. Este acúmulo pode estar relacionado ao aumento no fluxo de carbono na direção da síntese do ácido quínico, decorrente da aplicação do glyphosate, fato observado por Ossipov e Aleksandrova (1982) em acículas de pinheiro.

Orcaray et al. (2010) relataram o acúmulo de ácido quínico de 1,4; 2,4 e 1,6 vezes em folhas de ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Sugar Boys) tratadas com glyphosate, imazethapyr e chlorsulfuron, respectivamente, comparadas com a testemunha aos 15 dias após os tratamentos. Segundo os autores, pode-se considerar que o acúmulo de ácido quínico após o tratamento com glyphosate é devido ao acúmulo de compostos acima da EPSPs, como ocorre para os ácidos chiquímico, protocatecúico e gálico. No entanto, como também ocorre o acúmulo após a aplicação de imazethapyr e chlorsulfuron, este pode ser um efeito fisiológico geral no modo de ação de inibidores de aminoácidos, desempenhando um importante papel na toxicidade provocada por estes herbicidas. Os mesmos autores avaliaram os efeitos da aplicação exógena de ácido quínico em plantas de ervilha e observaram aumento nos teores de aminoácidos aromáticos em raízes e folhas de ervilha aos 7 dias após o tratamento, suportando a idéia de que as plantas podem utilizar o ácido quínico como fonte de carbono para a biossíntese desses aminoácidos (Leuschner e Schultz, 1991a e b).

Os teores de ácido desidrochiquímico, um composto intermediário da rota do ácido chiquímico, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Níveis de ácido desidrochiquímico ($\mu\text{g g}^{-1}$) em plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados ou isolados. Botucatu/SP, 2010.

Tratamentos	Períodos de Coleta							
	2 DAA	4 DAA	6 DAA	10 DAA		15 DAA		
	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha clorótica	Folha verde	Folha clorótica	
Testemunha	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-	0,0±0,0	-	
glyphosate (72 g ha ⁻¹)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-	0,0±0,0	-	
glyphosate (72 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	0,09±0,2	0,13±0,29	0,0±0,0	0,0±0,0	-	0,0±0,0	-	
glyphosate (720 g ha ⁻¹)	4,86±1,79	5,22±0,15	4,25±4,24	2,38±1,12	0,22±0,28	0,9±0,65	0,54±0,7	
glyphosate (720 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	3,91±0,67	4,17±0,73	2,57±2,76	0,58±0,47	1,1±0,47	1,23±1,32	1,34±0,56	
fosfito (3 L ha ⁻¹)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-	0,0±0,0	-	

Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.

Para o tratamento com glyphosate (72 g ha^{-1}) e fosfito de potássio isoladamente, não foram observados níveis de ácido desidrochiquímico nas folhas de milho. Foi observado um leve acúmulo do composto quando as plantas foram submetidas à aplicação do glyphosate na menor dose em associação com o fosfito, até 4 DAA, sendo que após 6 dias da aplicação do tratamento, não foram observados níveis do composto.

Após a aplicação do glyphosate na dose de 720 g ha^{-1} , isoladamente ou em associação com o fosfito, foram detectados níveis de ácido desidrochiquímico nas folhas que variaram de $0,22$ a $5,22 \mu\text{g g}^{-1}$ no tratamento com glyphosate isolado, e de $0,58$ a $4,17 \mu\text{g g}^{-1}$ na associação do glyphosate com o fosfito, durante o período avaliado. Os níveis de ácido desidrochiquímico foram semelhantes nas folhas verdes e amarelas, com exceção do tratamento com 720 g ha^{-1} de glyphosate, aos 10 DAA.

Nas Tabelas 13 a 15 estão apresentados os dados dos teores dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) em plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito de potássio.

Aos 2 DAA foi observada uma redução de 22% na concentração de fenilalanina em plantas de milho submetidas à dose de 720 g ha^{-1} de glyphosate isolado e de 11% quando associado ao fosfito, em relação à testemunha, comportamento observado também aos 4 DAA, com reduções de 38% e 33% em relação à testemunha, para o glyphosate isolado e em associação com o fosfito, respectivamente (Tabela 13). A partir de 6 DAA verificou-se um aumento nos níveis do aminoácido após a aplicação de glyphosate (720 g ha^{-1}) isolado e associado ao fosfito.

Em estudo realizado por Orcaray et al. (2010), também foi observada uma redução nos teores de aminoácidos aromáticos (soma de fenilalanina, tirosina e triptofano em relação ao aminoácidos totais) a partir do primeiro dia após o tratamento de plantas de ervilha com glyphosate, e após essa queda inicial transitória, voltou a aumentar.

Tabela 13. Níveis de fenilalanina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados ou isolados. Botucatu/SP, 2010.

Tratamentos	Períodos de Coleta									
	2 DAA		4 DAA		6 DAA		10 DAA		15 DAA	
	Folha	verde	Folha	verde	Folha	verde	Folha	verde	Folha	verde
Testemunha	189,3±10,3		212,3±157,2		203,8±70,4		157,3±51,4		103,9±14,9	
glyphosate (72 g ha ⁻¹)	188,0±36,2		148,8±39,3		311,3±91,6		116,8±36,3		259,5±51,8	
glyphosate (72 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	207,3±68,0		120,7±56,7		503,3±196,5		132,3±44,0		186,8±3,1	
glyphosate (720 g ha ⁻¹)	146,0±7,9		130,5±56,8		529,5±160,7		91,8±25,0		270,8±66,2	
glyphosate (720 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	166,8±46,9		142,0±33,8		271,0±83,2		264,8±17,5		281,7±70,76	
fosfito (3 L ha ⁻¹)	182,8±33,2		188,0±31,8		193,0±59,4		211,8±21,4		192,3±108,5	
Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.										

Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.

Petersen et al. (2007) verificaram um aumento pronunciado da concentração de fenilalanina em plantas de *B. napus* em resposta às concentrações de 1 e 10 μM de glyphosate, mas a concentração tende a decrescer, até a exposição a 50 μM de glyphosate, estando pouco abaixo da concentração encontrada na testemunha. Embora o glyphosate seja responsável pelo bloqueio da biossíntese dos aminoácidos aromáticos, os resultados observados pelos autores não revelaram um claro decréscimo no conteúdo de fenilalanina, tirosina e triptofano, quando suas concentrações em plantas expostas ao glyphosate são comparadas com as concentrações das plantas testemunhas.

Na Tabela 14 estão apresentados os dados dos teores de tirosina nas folhas de milho após a aplicação de glyphosate e fosfito. Foi verificado o mesmo comportamento observado para a fenilalanina, com um efeito transitório do glyphosate, reduzindo os teores de tirosina aos 2 e 4 DAA e logo em seguida, aos 6, 10 e 15 DAA, aumento dos níveis do aminoácido, em relação à maior dose de glyphosate (720 g ha^{-1}) isolada ou em associação com o fosfito. Gravena et al. (2009) verificaram também o efeito transitório do glyphosate nos teores de aminoácidos totais, com uma redução aos 2 DAA em folhas jovens e maduras de limão cravo submetidas à diferentes doses de glyphosate, e a partir de 4 DAA um aumento dos níveis dos aminoácidos, independentemente da dose de glyphosate testada.

No último período de avaliação (15 DAA), os teores de tirosina nos tecidos das folhas de milho foram superiores em todos os tratamentos quando comparados com a testemunha, sem aplicação, fato também observado para os outros aminoácidos avaliados (fenilalanina e triptofano).

Os teores de triptofano nas folhas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito mostraram uma tendência diferente da observada para os outros aminoácidos (fenilalanina e tirosina), com aumento de até 13% em relação à testemunha aos 2 DAA para a maior dose de glyphosate (720 g ha^{-1}) em associação com o fosfito (Tabela 15). Uma possível explicação para este fato, como afirmou Amrhein et al. (1980), é que o triptofano é o aminoácido aromático menos sensível à inibição pelo glyphosate, em partes devido à afinidade da enzima pelo corismato. Resultado semelhante foi obtido por Wang et al. (2001) com aumento da concentração de triptofano em plântulas de *Cyperus rotundus* tratadas com glyphosate aos 3 dias após o tratamento, quando comparadas com a testemunha.

Aos 4, 6 e 10 DAA foi observada uma tendência de decréscimo nos teores de triptofano nas folhas de milho em todos os tratamentos testados em relação à testemunha. No entanto, aos 15 DAA todos os tratamentos apresentaram teores de triptofano superiores ao da testemunha.

O conteúdo de aminoácidos aromáticos foi analisado em células de *Nicotiana plumbaginifolia* quatro dias após a adição de 100 μ M de glyphosate em meio de cultura por Forlani et al. (2000), e os autores verificaram redução na concentração de tirosina e fenilalanina, 59% e 77%, respectivamente, enquanto que o teor de triptofano reduziu somente 13%.

Na Tabela 16 estão apresentados os coeficientes de correlação entre os compostos analisados. Os compostos que apresentaram a maior correlação entre os níveis encontrados nas plantas foram o ácido chiquímico e o ácido quínico ($r = 0,95$), seguido dos aminoácidos fenilalanina e tirosina ($r = 0,86$) e ácido chiquímico com ácido desidrochiquímico ($r = 0,72$), indicando uma forte correlação entre os níveis desses compostos, ou seja, à medida que a concentração de um aumenta, a concentração do outro aumenta também. Foi observada uma correlação mediana entre os níveis de ácidos quínico e desidrochiquímico e entre os níveis dos aminoácidos fenilalanina e triptofano. Todas as correlações que foram consideradas fortes ou medianas estão representadas nas Figuras 19 a 21.

Tabela 14. Níveis de tirosina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados ou isolados.
Botucatu/SP, 2010.

Tratamentos	Períodos de Coleta							
	2 DAA	4 DAA	6 DAA	10 DAA		15 DAA		
	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha verde	Folha clorótica	Folha verde	Folha clorótica	
Testemunha	52,6±3,6	59,4±8,3	72,4±14,6	60,1±29,1	-	31,5±12,3	-	
glyphosate (72 g ha ⁻¹)	55,8±6,1	53,9±6,7	108,9±12,1	39,6±8,3	-	75,2±9,8	-	
glyphosate (72 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	66,2±15,4	57,4±20,8	172±35,2	44,8±8,0	-	78,0±17,4	-	
glyphosate (720 g ha ⁻¹)	35,8±2,9	42,9±19,4	142,1±39,7	37,9±12,0	13,5±7,5	108,2±18,9	20,1±5,9	
glyphosate (720 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	43,6±16,1	39,4±8,7	97,5±28,8	53,6±13,3	36,9±9,1	145,4±93,5	51,1±10,8	
fosfito (3 L ha ⁻¹)	60,9±8,7	60,3±10,2	71,6±15,7	50,6±4,5	-	72,4±23,6	-	
Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.								

Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.

Tabela 15. Níveis de triptofano ($\mu\text{g g}^{-1}$) em plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados ou isolados.
Botucatu/SP, 2010.

Tratamentos	Períodos de Coleta									
	2 DAA		4 DAA		6 DAA		10 DAA		15 DAA	
	Folha	verde	Folha	verde	Folha	verde	Folha	verde	Folha	verde
Testemunha	201,0±13,5		261,3±31,6		381,0±117,3		202,3±77,9		132,9±93,2	-
glyphosate (72 g ha⁻¹)	217,8±34,9		211,0±119,3		401,3±140,9		138,5±49,0		290,0±200,3	-
glyphosate (72 g ha⁻¹) + fosfito (3 L ha⁻¹)	216,5±54,1		177,1±108,7		442,3±254,4		164,0±29,8		171,0±79,1	-
glyphosate (720 g ha⁻¹)	195,0±49,1		177,0±90,9		575,3±188,9		111,9±50,6		151,5±47,8	17,7±6,6
glyphosate (720 g ha⁻¹) + fosfito (3 L ha⁻¹)	225,3±37,5		206,5±38,1		221,5±88,4		197,3±70,5		165,8±82,0	72,8±36,9
fosfito (3 L ha⁻¹)	258,0±35,1		236,0±133,4		292,0±93,8		176,5±44,1		193,5±77,6	-

Intervalo de confiança a 10% de probabilidade.

Tabela 16. Coeficientes de correlação entre os diferentes compostos analisados. Botucatu/SP, 2010.

	Ácido chiquímico	Ácido quínico	Ácido Desidrochiquímico	Fenilalanina	Tirosina	Triptofano
Ácido chiquímico	1	-	-	-	-	-
Ácido quínico	0,9556	1	-	-	-	-
Ácido Desidrochiquímico	0,7298	0,6869	1	-	-	-
Fenilalanina	0,1287	0,2257	0,0496	1	-	-
Tirosina	0,0653	0,1957	-0,0691	0,8615	1	-
Triptofano	-0,0240	0,0291	0,1074	0,6336	0,4513	1

Foi verificada uma alta correlação positiva entre os níveis dos ácidos chiquímico e quínico, sendo que a concentração do ácido chiquímico foi quatro vezes maior que a concentração do ácido quínico (Figura 19). O teor de ácido chiquímico é utilizado para diagnosticar a intoxicação das plantas suscetíveis ao herbicida glyphosate, sendo assim, o ácido quínico também pode ser considerado um indicador da fitointoxicação.

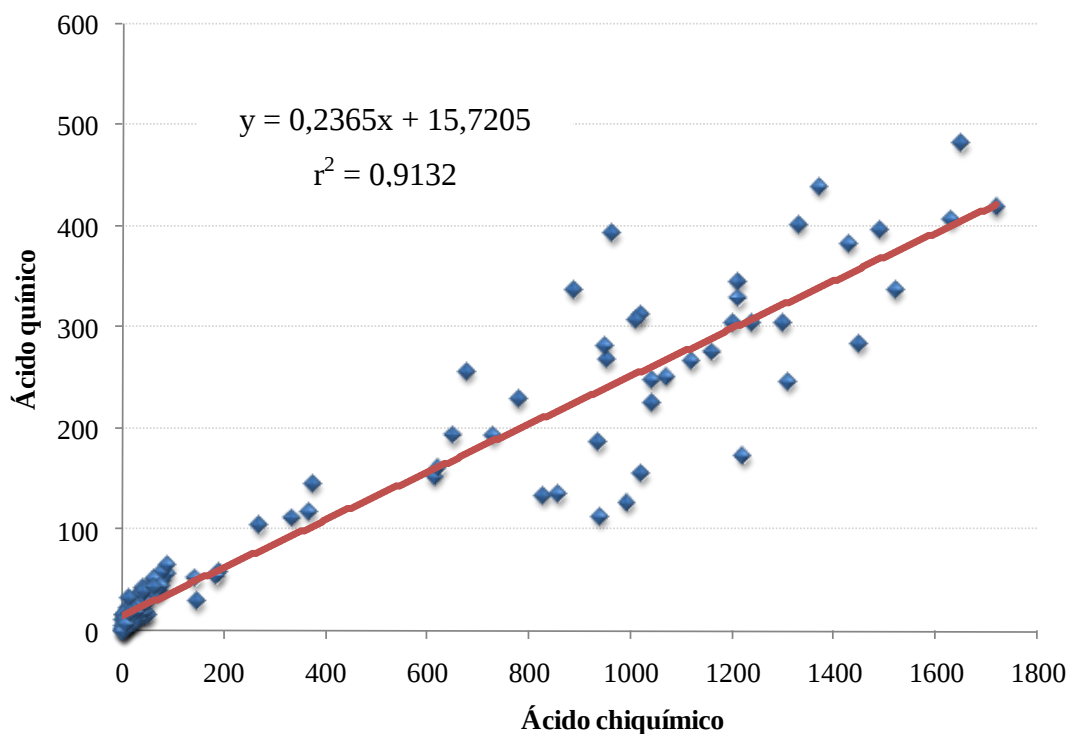


Figura 19. Correlação entre os níveis de ácido quínico e ácido chiquímico nas folhas de milho. Botucatu/SP, 2010.

Os níveis dos ácidos chiquímico e quínico correlacionaram-se positivamente, forte e medianamente, respectivamente, com o ácido desidrochiquímico. A concentração de ácido chiquímico nas plantas de milho foi aproximadamente 400 vezes maior e o ácido quínico foi aproximadamente 100 vezes maior do que ácido desidrochiquímico (Figura 20).

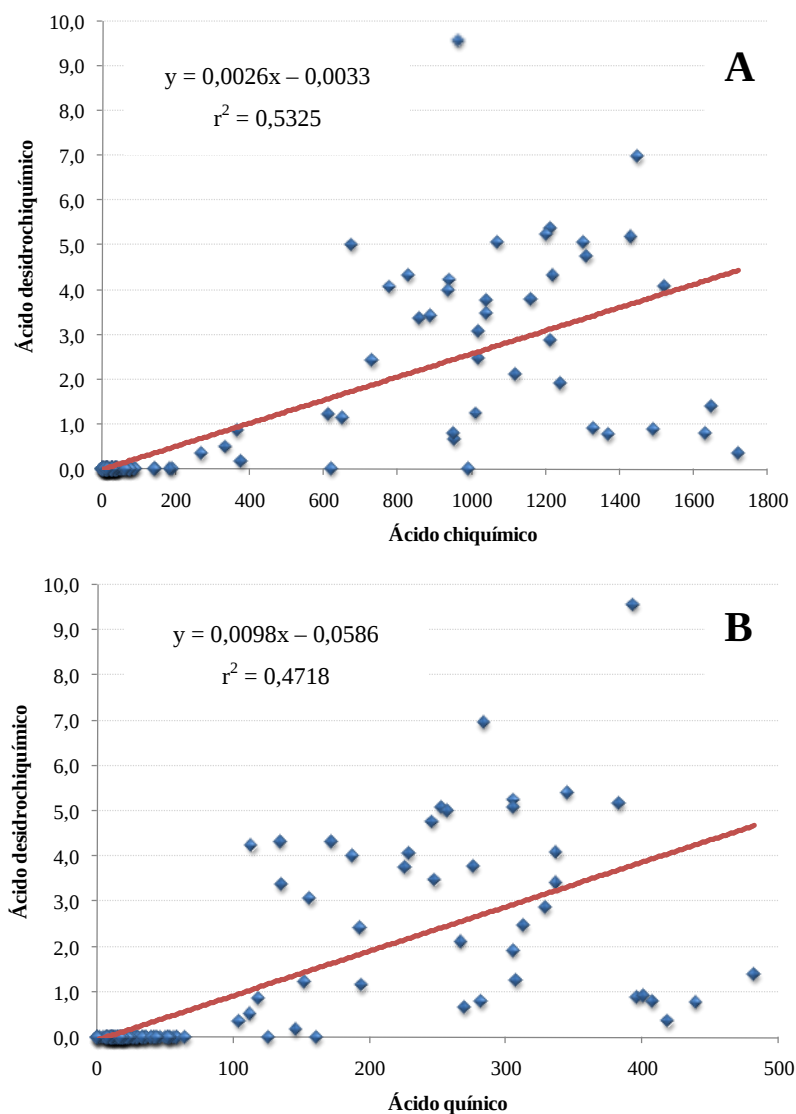


Figura 20. Correlação entre os níveis de ácido desidrochiquímico e ácido chiquímico (A); ácido desidrochiquímico e ácido quínico (B) nas folhas de milho. Botucatu/SP, 2010.

Os níveis de fenilalanina correlacionaram-se fortemente com os níveis de tirosina, e medianamente com os níveis de triptofano (Figura 21). Segundo Petersen et al. (2007), há uma tendência semelhante no desenvolvimento de fenilalanina e tirosina em plântulas de *B. napus*, onde o aumento da concentração na menor exposição ao glyphosate (1 e 10 μ M) é seguido por uma diminuição na concentração em exposições à altas concentrações do herbicida (20 a 50 μ M).

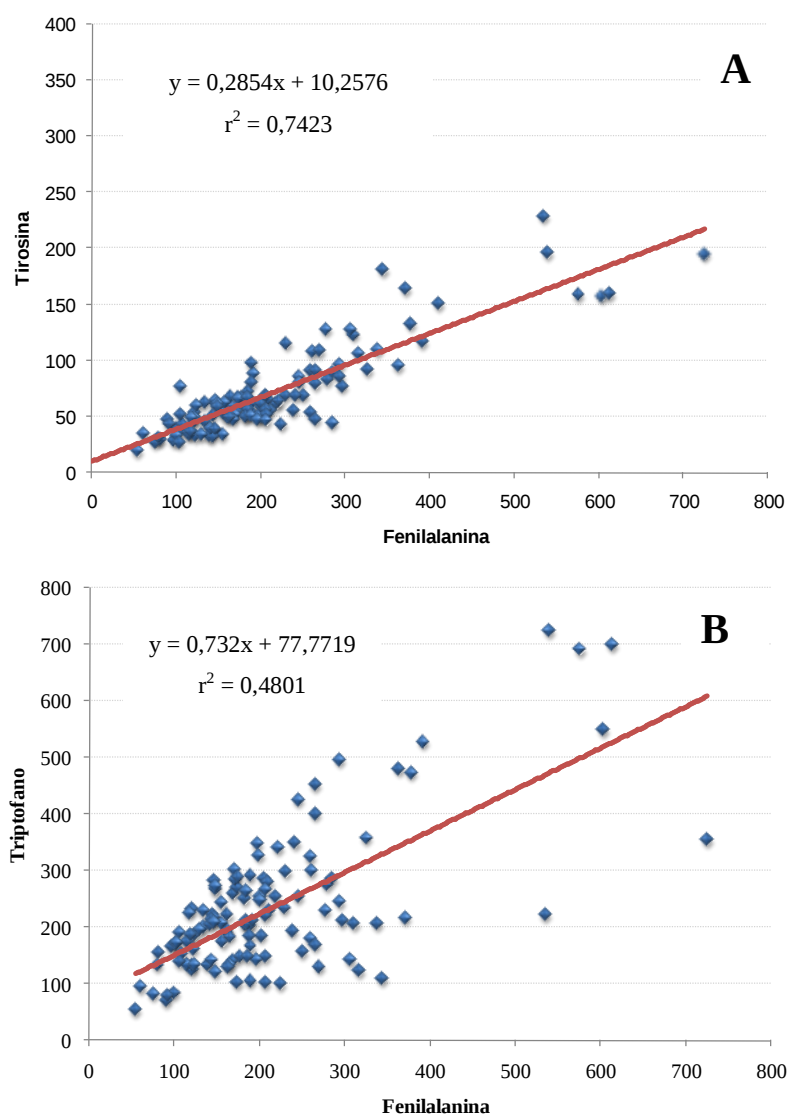


Figura 21. Correlação entre os níveis de tirosina e fenilalanina (A); triptofano e fenilalanina (B) nas folhas de milho. Botucatu/SP, 2010.

Os dados de porcentagem de intoxicação das plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito estão apresentados na Tabela 17. Para a dose de 72 g ha⁻¹ de glyphosate, as plantas apresentaram poucos sintomas de intoxicação, com pequenas manchas cloróticas nas folhas novas. A associação desta dose com o fosfito, ao contrário dos resultados apresentados por Ibrahim et al. (2010 a e b) em plantas de pupunha, causou maior intoxicação nas plantas de milho do que a aplicação do glyphosate isoladamente. Aos 15 DAA, as plantas submetidas à aplicação de glyphosate (72 g ha⁻¹) apresentaram 1,3% de intoxicação, já quando foi associada ao fosfito, a intoxicação foi de 16,3%.

As plantas apresentaram altos níveis de intoxicação quando submetidas à dose de 720 g ha⁻¹ de glyphosate isolado e em associação com o fosfito. Aos 15 DAA a intoxicação das plantas submetidas ao glyphosate isolado foi 14,3 % maior do que àquelas onde foi aplicado o glyphosate associado ao fosfito. As plantas de milho não apresentaram sintomas de intoxicação nos períodos avaliados, após a aplicação do fosfito de potássio isoladamente.

Foi observado aumento significativo da massa seca do colmo, e da altura das plantas de milho submetidas à dose de 72 g ha⁻¹ de glyphosate isoladamente, quando comparadas com as plantas sem aplicação (Tabela 18). Para a associação desta mesma dose com o fosfito, verificou-se redução significativa da altura das plantas, de aproximadamente 54% em relação à testemunha, evidenciando os altos níveis de intoxicação das plantas. Diversos trabalhos evidenciaram o estímulo de crescimento de plantas à baixas doses do herbicida glyphosate (Schanbenberger et al., 1999; Wagner et al., 2003; Duke et al., 2006; Cedergreen et al., 2007; Godoy, 2007; Carbonari et al., 2007a; Carbonari et al., 2007b e Velini et al., 2008). O bloqueio parcial da EPSPs, através da aplicação de baixas doses de glyphosate, implicou em estímulos ao crescimento de várias espécies vegetais, incluindo eucalipto, pinus, milho e soja (não transgênica e suscetível ao glyphosate). O estímulo de crescimento de uma planta por baixas doses de um composto tóxico é denominado “hormesis” (Velini et al., 2009).

Tabela 17. Porcentagem de intoxicação das plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados ou isolados.
Botucatu/SP, 2010.

Tratamentos	Períodos de Avaliação				
	2 DAA	4 DAA	6 DAA	10 DAA	15 DAA
Testemunha	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
glyphosate (72 g ha ⁻¹)	3,0 b	3,0 a	0,5 a	1,3 a	1,3 a
glyphosate (72 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	5,0 b	9,3 b	7,5 b	21,3 b	16,3 b
glyphosate (720 g ha ⁻¹)	14,3 d	17,5 c	23,8 c	53,8 c	84,3 d
glyphosate (720 g ha ⁻¹) + fosfito (3 L ha ⁻¹)	11,3 c	20,8 c	28,5 d	65,0 d	70,0 c
fosfito (3 L ha ⁻¹)	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
F tratamento	36,587**	39,940**	79,602**	100,757**	87,133**
C.V. (%)	35,19	33,90	28,72	24,65	28,69
D. M. S.	2,404	3,498	3,537	7,116	10,071

** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; * significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t a 10% de probabilidade.

Tabela 18. Massa seca de folhas e colmos (g) e altura (cm) das plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados ou isolados. Botucatu/SP, 2010.

Tratamentos	Massa seca de folhas (g)	Massa seca de colmos (g)	Altura (cm)
Testemunha	20,0 a	28,8 b	104,3 b
glyphosate (72 g ha⁻¹)	21,3 a	44,5 a	136,0 a
glyphosate (72 g ha⁻¹) + fosfito (3 L ha⁻¹)	20,3 a	31,8 b	47,8 c
glyphosate (720 g ha⁻¹)	10,8 c	12,5 c	41,5 c
glyphosate (720 g ha⁻¹) + fosfito (3 L ha⁻¹)	12,8 bc	14,3 c	42,5 c
fosfito (3 L ha⁻¹)	17,5 ab	34,8 ab	114,5 b
F tratamento	3,210*	6,191**	52,916**
C.V. (%)	28,48	35,74	14,25
D. M. S.	5,965	12,162	14,172

** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; * significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t a 10% de probabilidade.

Embora os estímulos de crescimento das plantas relatados nos trabalhos ocorressem em doses muito baixas do glyphosate, de 1,8 a 36 g e.a. ha⁻¹, o estímulo de crescimento observado para o milho foi para a aplicação da dose de 72 g e.a. ha⁻¹. Segundo Velini et al. (2010), doses baixas do glyphosate não são recomendadas como estimulantes de crescimento para culturas, pois a dose que causa o efeito estimulante pode variar consideravelmente dependendo de muitos fatores, inclusive o clima, a variedade da planta, o estágio de desenvolvimento, e a formulação do glyphosate.

Não foram observadas diferenças significativas para as características apresentadas na Tabela 18 entre a aplicação do glyphosate (720 g ha⁻¹) isolado e associado ao fosfito nas plantas de milho, portanto, os maiores níveis de intoxicação das plantas após aplicação do glyphosate isolado, não refletiu em maiores perdas de massa seca e altura em relação àquelas submetidas à aplicação da mistura do herbicida em sua maior dose com o fosfito.

Para a aplicação do fosfito isoladamente, não foram observadas diferenças significativas de massa seca de folhas e colmo, e de altura das plantas, quando comparadas com a testemunha (Tabela 18).

Nas Figuras 22 e 23 está apresentado o fluxo de transporte de elétrons (ETR) no fotossistema II das folhas jovens e maduras, respectivamente, após a aplicação de glyphosate e fosfito. Os valores estão expressos como porcentagem da testemunha. As folhas jovens foram as primeiras a apresentar sintomas de intoxicação após a aplicação do glyphosate (720 g ha^{-1}) isolado e em associação com o fosfito, com 20% de queda do fluxo de transporte de elétrons aos 2 DAA. A máxima redução do ETR ocorreu 200 horas após a aplicação (HAA), ou seja, aproximadamente 8 DAA, com 70% de redução em relação à testemunha, mantendo-se até o último período avaliado.

Para a aplicação de glyphosate (72 g ha^{-1}) associado ao fosfito, foi observada redução de 20% do ETR, mas com posterior recuperação até 350 HAA (15 DAA).

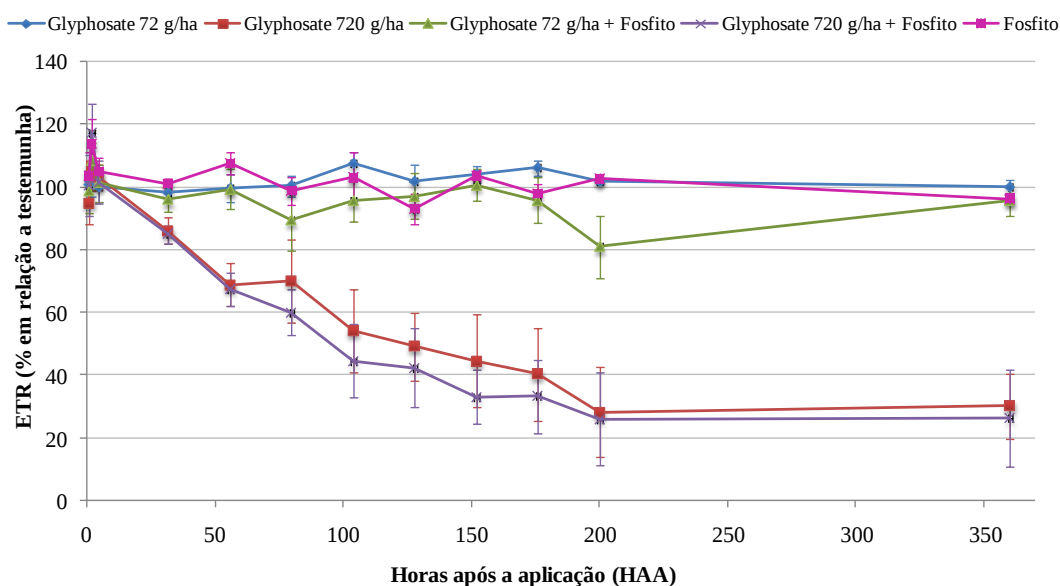


Figura 22. Taxa de transporte de elétrons (ETR) de folhas jovens de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados e isolados. Botucatu/SP, 2010.

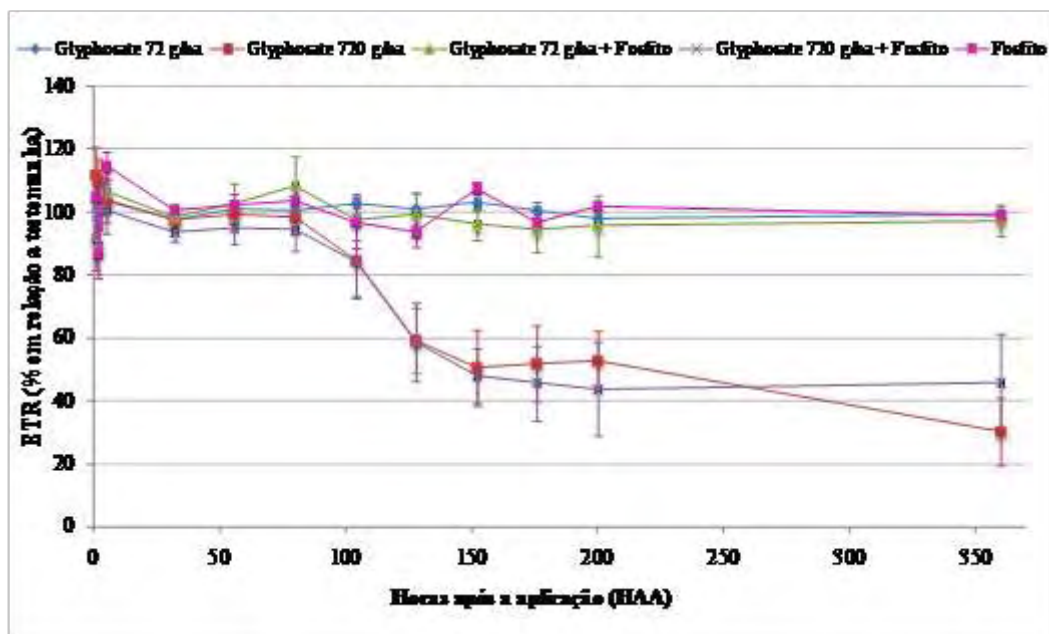


Figura 23. Taxa de transporte de elétrons (ETR) de folhas maduras de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados e isolados. Botucatu/SP, 2010.

Com relação às folhas maduras (Figura 23), foi observada uma redução de aproximadamente 20% do ETR, cinco dias após a aplicação do glyphosate (720 g ha⁻¹), isoladamente e em associação com o fosfito. Para a aplicação do glyphosate isolado, foi observada maior redução (70%) ao final do experimento, quando comparado com a aplicação combinada com o fosfito, com a máxima redução de aproximadamente 45% do ETR. Todos os outros tratamentos não diferiram da testemunha, ou seja, não foi alterado o fluxo de elétrons das plantas de milho. Observa-se que a redução do ETR, tanto nas folhas jovens como nas maduras (Figuras 22 e 23), foi acompanhada pelo aumento da intoxicação das plantas durante o período avaliado (Tabela 17).

Shieh et al. (1991), relataram para *Beta vulgaris*, que o acúmulo de ácido chiquímico decorrente da ação do glyphosate pode representar um forte dreno de carbono no ciclo de Calvin, pelo redirecionamento de eritrose-4-fosfato, reduzindo drasticamente a taxa fotossintética. Fuchs et al. (2002) também mostraram uma drástica redução na assimilação do dióxido de carbono após a aplicação do glyphosate em *A. teophrasti*.

Nas primeiras horas após a aplicação dos tratamentos, ocorreu um aumento do ETR nas folhas jovens e maduras (Figuras 23 e 24). Nos tratamentos onde foi aplicado o glyphosate na dose de 72 g ha^{-1} , não houve nenhuma redução do ETR, sendo que na maioria dos períodos de avaliação, essas plantas apresentaram ETR maior do que o da testemunha sem aplicação. Este efeito no ETR pode estar relacionado também ao aumento do crescimento dessas plantas.

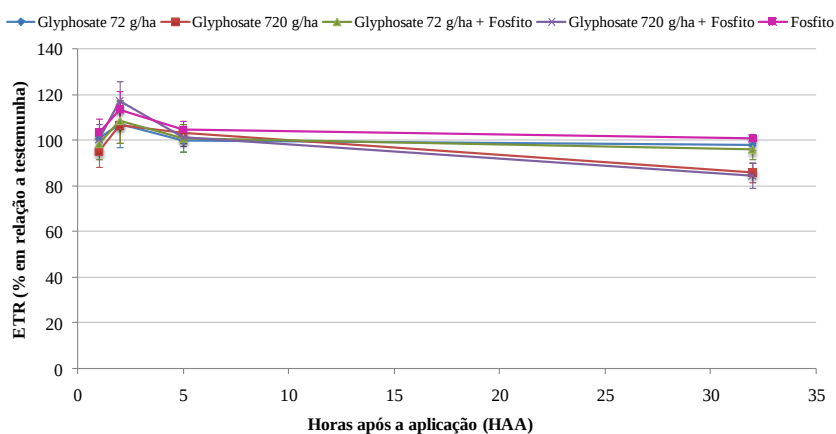


Figura 23. Taxa de transporte de elétrons (ETR) de folhas jovens de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados e isolados até 32 horas após a aplicação (HAA). Botucatu/SP, 2010.

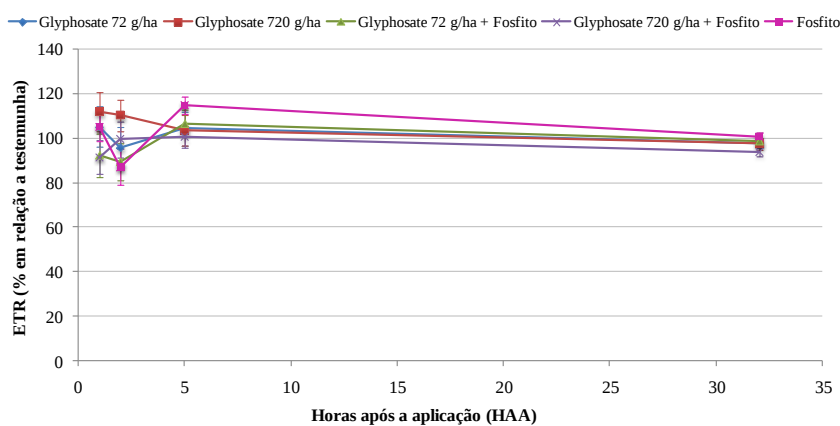


Figura 24. Taxa de transporte de elétrons (ETR) de folhas jovens de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito associados e isolados até 32 horas após a aplicação (HAA). Botucatu/SP, 2010.

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram conduzidos os experimentos foi possível concluir que:

- Os métodos de extração e análise dos compostos desenvolvidos foram adequados para alcançar os objetivos propostos;
- O glyphosate e seu principal metabólito (AMPA) foram detectados somente nas plantas submetidas à aplicação da maior dose de glyphosate (720 g ha^{-1}) em associação ou não com o fosfito de potássio;
- As plantas de milho acumularam altos níveis de ácido chiquímico e ácido quínico após a aplicação da dose de 720 g ha^{-1} de glyphosate, associada ou não ao fosfito de potássio;
- Os níveis de ácido chiquímico nas plantas submetidas ao glyphosate na dose de 72 g ha^{-1} em associação com o fosfito de potássio foram superiores aos encontrados no tratamento com a mesma dose do glyphosate isoladamente, e da testemunha. Estes dois compostos apresentaram alta correlação entre si;
- O ácido desidrochiquímico foi acumulado em pequenas quantidades somente nas plantas submetidas à aplicação do glyphosate (720 g ha^{-1}) associado ou não ao fosfito de potássio, e apresentou correlação mediana com os ácidos chiquímico e quínico;
- O efeito do glyphosate nos teores de fenilalanina e tirosina foi apenas transitório, ou seja, redução nos primeiros períodos de avaliação, com posterior aumento nos níveis dos

aminoácidos na última avaliação (15 DAA). Os teores de triptofano foram superiores ao da testemunha aos 15 DAA em todos os tratamentos testados;

- O fosfito de potássio em associação com o glyphosate na dose de 72 g ha^{-1} , foi responsável pelo aumento dos níveis de intoxicação visual das plantas de milho;

- As plantas de milho submetidas à dose de 72 g ha^{-1} isolada, apresentaram maior crescimento do que as da testemunha (sem aplicação do glyphosate);

- O fluxo de transporte de elétrons sofreu alteração somente nas plantas submetidas à maior dose de glyphosate (720 g ha^{-1}) em associação ou não com o fosfito de potássio, sendo observada uma redução primeiramente nas folhas jovens e posteriormente nas folhas maduras.

8 REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2010. **Anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP, 2009. 496 p.

ALBERTINI, M. V. et al. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, p. 8335-8339, 2006.

AMRHEIN, N. et al. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 830-834, 1980.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solo**. 2002. 72 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícolas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ARREGUI, M. C. et al. Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. **Pest Management Science**, New York, v. 60, p. 163-166, 2003.

BALASUBRAMANIAN, S.; ABELL, C.; COGGINS, J. R. Observation of an isotope effect in the chorismate synthase reaction. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 112, p. 8581-8583, 1990.

BARRET, K. A.; MCBRIDE, M. B. Oxidative degradation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by manganese oxide. **Environmental Science Technology**, Washington, DC, v. 39, p. 9223-9228, 2005.

BARRY, G. et al. Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: SINGH, B. K.; FLORES, H. E.; SHANNON, J. C. **Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1992. p. 139-145.

BECERRIL, J. M.; DUKE, S. O.; LYDON, J. Glyphosate effect on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvet leaf. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, p. 695-699, 1989.

BENTLEY, R. The shikimate pathway: a metabolic tree with many branches. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 25, p. 307-384, 1990.

BOUDET, A. M.; GRAZIANA, A.; RANJEVA, R. Recent advances in the regulation of the prearomatic pathway. In: VAN SUMERE, C. F.; LEA, P. J. (Eds.). **Annual proceedings of the Phytochemical Society of Europe**. Oxford: Clarendon Press, 1985. v. 25, p. 135-159.

BRESNAHAN, G. A. et al. Glyphosate applied preharvest induces shikimic acid accumulation in hard red spring wheat (*Triticum aestivum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 51, p. 4004-4007, 2003.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. 3rd ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.

BUEHRING, N. W.; MASSEY, J. H.; REYNOLDS, D. B. Shikimic acid accumulation in field-grown corn (*Zea mays*) following simulated glyphosate drift. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 819-824, 2007.

CABANÉ, M. et al. Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 586-594, 2004.

CARBONARI, C. A.; MESCHEDE, D. K.; VELINI, E. D. Efeito da aplicação de glyphosate no crescimento inicial de mudas de eucalipto submetidas a dois níveis de adubação fosfatada. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FEPAF, 2007a. p. 68-70.

CARBONARI, C. A.; MESCHEDE, D. K.; VELINI, E. D. Acúmulo de fósforo em plantas de eucalipto submetidas a aplicação de diferentes doses de glyphosate. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FEPAF, 2007b. p. 76-78.

CARVALHO, L. B. et al. Estudo comparativo do acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de milho var. BR-106 e *Brachiaria plantaginea*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 2, p. 293-301, 2007.

CASELEY, J. C.; COUPLAND, D. Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake movement and acidity. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. A. **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 92-123.

CASTRO, P. R. C. A rota do ácido chiquímico e a sua importância na defesa da planta. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 119, p. 3, 2007.

CATANEO, A. C. et al. Atividade de glutathione S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 307-312, 2003.

CEDERGREEN, N. et al. The occurrence of hormesis in plants and algae. **Dose-Response**, Amherst, v. 5, p. 150-162, 2007.

CENTENO, A. J. Glyphosate: uma visão ambiental. In: VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Botucatu: Fepaf, 2009. p. 145-152.

CESSNA, A. J. et al. Residues of glyphosate and its metabolite AMPA in field pea, barley, and flax seed following preharvest applications. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 82, p. 485-489, 2002.

CESSNA, A. J. et al. Residues of glyphosate and its metabolite AMPA in canola seed following preharvest applications. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 80, p. 425-431, 2000.

CESSNA, A. J. et al. Residues of glyphosate and its metabolite AMPA in wheat seed and foliage following preharvest applications. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 74, p. 653-661, 1994.

CESSNA, A. J.; WADDINGTON, J. Dissipation of glyphosate and its metabolite AMPA in established crested whatgrass following spring application. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 75, p. 759-762, 1995.

CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpetcreeper with glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 49, p. 156-163, 2001.

COLE, D. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. **Pesticide Science**, New York, v. 42, p. 201-222, 1994.

COLE, D.; PALLET, K.; RODGERS, M. Discovering new modes of action for herbicides and the impact of genomics. **Pesticide Outlook**, Piccadilly, v. 11, p. 223-229, 2000.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. 3rd ed. Bruxelles, 2007. 42 p. (Document n. SANCO, 3131).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra 2009/2010**. 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em: 21 dez. 2010.

COX, C. Glyphosate (Roundup). **Journal of Pesticide Reform**, Fall, v. 18, n. 3, p. 10-15, 1998.

DELLACIOPPA, G. et al. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 83, p. 6973-6877, 1986.

DENIS, M. H.; DELROT, S. Carrier-mediate uptake of glyphosate in brad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 87, p. 569-575, 1993.

DEVINE, M. D.; BANDENN, J. D.; MCKERSIE, B. D. Temperature effects on glyphosate absorption, translocation and distribution quack grass (*Agropyron repens*). **Weed Science**, Champaign, v. 31, p. 461-464, 1993.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of shikimate metabolites. **Natural Products Reports**, Piccadilli, v. 15, p. 17-58, 1998.

DIAZ, J.; MERINO, F. Shikimate dehydrogenase from pepper (*Capsicum annum*) seedlings. Purification and properties. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 147-152, 1997.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied microbiology Biotechnology**, Frankfurt, v. 43, n. 3, p. 545-550, 1995.

DILL, G. M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. **Pest Management Science**, NewYork, v. 61, p. 219-224, 2005.

DING, L. et al. Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 8, p. 2053-2067, 2007.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360 p.

DUKE, S. O. et al. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 51, p. 340-344, 2003.

DUKE, S. O. et al. The occurrence of hormesis in plants and algae. **Dose-Response**, Amherst, v. 5, p. 150-162, 2006.

DUKE, S. O. Glyphosate. In: KEARNEY, P. C.; KAUFMAN, D. D. **Herbicides**: chemistry, degradation, and mode of action. New York: Dekker, 1988. v. 3, p. 1-70.

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1158, p. 174-183, 2007.

FENG, J. C. et al. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, Champaign, v. 52, p. 498-505, 2004.

FENG, J. C.; THOMPSON, D. G. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed 2: persistence in foliage and soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 38, p. 1118-1125, 1990.

FENN, M. E.; COFFEY, M. D. Antifungal activity of Fosetyl-Al and phosphorous acid. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 606-611, 1984

FORLANI, G.; LEJCZAK, P.; KAFARSKI, P. The herbicidally active compound N-2-(5-chloropyridyl) aminomethylene bisphosphonic acid acts by inhibiting both glutamine and aromatic amino acid biosynthesis. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 27, p. 677-683, 2000.

FORSTER, H. et al. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility to Phytophthora root and crown rot in hydroponic culuture. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, p. 1165-1170, 1998.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate**: a unique global herbicide. Washington, DC: American Chemical Society, 1997. 678 p.

FUCHS, M. A. et al. Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medikus). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 74, n. 1, p. 27-39, 2002.

GAILLE, C.; KAST, P.; HAAS, D. Salicylate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 24, p. 21768-21775, 2002.

GARCIA, J. C. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006. 12 p. (Circular técnica, n. 74).

GAZZIERO, D. L. P.; ADEGAS, F.; VOLL, E. Plantio direto no Brasil e o glyphosate. In: VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Fepaf: Botucatu, 2009.p. 191-210.

GEIGER, D. R.; KAPITAN, S. W.; TUCCI, M. A. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, n. 2, p. 468-472, 1986.

GEIGER, D. R.; TUCCI, M. A.; SERVIATES, J. C. Glyphosate effects on carbon assimilation and gas exchange in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 2, p. 365-369, 1987.

GIMSING, A. L.; BORGGAARD, O. K. Competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides. **Clay Minerals**, London, v. 37, n. 3, p. 509-515, 2002.

GIMSING, A. L.; BORGGAARD, O. K.; BANG, M. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 55, p. 183-191, 2004.

GITZ, D. C. et al. Effect of a PAL inhibitor on phenolic accumulation and UV-B tolerance in *Spirodela intermedia* (Koch.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 398, p. 919-927, 2004.

GODOY, M. C. **Efeitos do glyphosate sobre o crescimento e absorção do fósforo pela soja**. 2007. 43 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

GONÇALVES, F. F. **Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo de arroz irrigado**. 2007. 127 p. Tese (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

GOUGLER, J. A.; GEIGER, D. R. Uptake and distribution of N-(phosphonomethyl) glycine in sugar beet plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, p. 668-672, 1981.

GRAVENA, R. et al. Low glyphosate rates do not affect *Citrus limonia* (L.) Osbeck seedlings. **Pest Management Science**, NewYork, v. 65, p. 420-425, 2009.

GUILLET, G. et al. Expression of tryptophan decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes in tobacco results in altered biochemical and physiological phenotypes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 933-943, 2000.

HALLAS, L. E.; HAHN, E. M.; KOMDORFER, C. Characterization of microbial traits associated with glyphosate biodegradation in industrial activated sludge. **Journal of Industrial Microbiology**, Fairfax, v. 3, p. 377-385, 1988.

HARRING, T.; STREIBIG, J. C.; HUSTED, S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 46, p. 4406-4412, 1998.

HARTZFELD, P. W. et al. Determination of hydrolysable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 50, p. 1785-1790, 2002.

HASLAM, E. **Shikimic acid**: metabolism and metabolites. Chinchester: John Wiley, 1993. 392 p.

HAWKES, T. R. et al. Chorismate synthase, presteady- state kinetics of phosphate release from 5-enolpyruvylshikimate 3- phosphate. **Biochemical Journal**, London, v. 265, p. 899-902, 1990.

HERNANDEZ, A.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; BECERRIL, J. M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 47, p. 2920-2925, 1999.

HERRMANN, K. M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 907-919, 1995.

HERRMANN, K. M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 473-503, 1999.

HETHERINGTON, P. R. et al. Absorption and efflux of glyphosate by cells suspensions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 320, p. 527-533, 1998.

HOAGLAND, R. E. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds: VI. Effects of glyphosine and glyphosate metabolites on phenylalanine ammonia-lyase activity, growth, and protein, chlorophyll, and anthocyanin in soybean (*Glycine max*). **Weed Science**, Champaign, v. 28, p. 393-400, 1980.

HONEGGER, J. L. et al. Glyphosate transport in plants. In: CORNSHAW, J.; LUCAS, W. J.; GIAQUINTA, R. T. **Phloem transport**. New York: A. R. Liss, 1986. p. 216-268.

IBAOUI, H. E. et al. Uptake and release of a non phloem-mobile (iprodione) xenobiotic by broadbean leaf tissues. **Physiologie Végétale**, Montrouge Cedex, v. 24, p. 431-442, 1986.

IBRAHIN, F. N. et al. Interação glyphosate e fosfito-K no acúmulo de chiquimato em plantas de pupunha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 2010a. p. 3007-3009.

IBRAHIN, F. N. et al. Efeito da interação glyphosate e fosfito-K no manejo de plantas daninhas na cultura da pupunha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 2010b. p. 3276-3279.

JACKSON, T. J. et al. Action of fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Loughborough, v. 49, p. 147-154, 2000.

JEE, H. J.; CHO, W. D.; KIM, C. H. Effect of potassium phosphonate on the control of phytophthora root rot of lettuce in hydroponics. **Plant Pathology**, Loughborough, v. 18, n. 3, p. 142-146, 2002.

JENSEN, R. A. The shikimate arogenate pathway- link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 66, p. 164-168, 1986.

JONES, J. D. et al. Impaired wound induction of DAHP synthase and altered stem development in transgenic potato plants expressing a DAHP synthase antisense construct. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 774-783, 1995.

KARAM, D. et al. Características do herbicida tembotrione na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2009. 6p. (Circular técnica, n. 129).

KARAM, D.; OLIVEIRA, M. F. Seletividade de herbicidas na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2007. 8p. (Circular técnica, n. 98).

KAWAMOTO, H.; NAKATSUBO, F.; MURAKAMI, K. Stoichiometric studies of tannins-protein co-precipitation. **Phytochemistry**, New York, v. 41, n. 5, p. 1427-1431, 1996.

KERTESZ, M. A.; COOK, A. M.; LEISINGER, T. Microbial metabolism of sulfur and phosphorous containing xenobiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, Delft, v. 15, n. 2-3, p. 195-215, 1994.

KIRKWOOD, R. C.; MCKAY, I. Accumulation and elimination of herbicides in select crop and weed species. **Pesticide Science**, New York, v. 42, p. 241-249, 1994.

KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 349-353, 1996.

LAITIEN, P. et al. Fate of the herbicides glyphosate, glufosinate-ammonium, phenmedipham, ethofumesate and metamitron in two finnish arable soils. **Pest Management Science**, New York, v. 62, p. 473-491, 2006.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62 p.

LEUSCHNER, C.; HERRMANN, K. M.; SCHULTZ, G. The metabolism of quinate in pea roots: purification and partial characterization of a quinate hydrolyase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 319-325, 1995.

LEUSCHNER, C.; SCHULTZ, G. Non-light-dependent shikimate pathway in plastids from pea roots. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 104, p. 240-244, 1991.

LEUSCHNER, C.; SCHULTZ, G. Uptake of shikimate pathway intermediates by intact chloroplasts. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, p. 2203-2207, 1991.

LINDERS, J. B. H. J. et al. **Pesticides: benefaction or Pandora's box? A synopsis of the environmental aspect of 243 pesticides**. Bilthoven: National Institute of Public Health and Environment, 1994. 204 p. Report 67101014.

LUCAS, R. E.; WARNCKE, D. D.; THORPE, V. A. Phosphite injury to corn. **Agronomy Journal**, Madison, v. 71, p. 1063-1065, 1979.

LUCHINI, L. C. Considerações sobre algumas propriedades físico-químicas do glyphosate. In: VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Botucatu: Fepaf, 2009. p. 21-30.

LYDON, J.; DUKE, S. O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 36, p. 813-818, 1988.

MAHER, E. A. et al. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 91, p. 7802-1806, 1994.

MANNERVIK, B.; DANIELSON, U. H. Glutathione transferases: structure and catalytic activity. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 23, p. 283-337, 1988.

MARÍA, N. et al. New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: role of shikimate accumulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, p. 2621-2628, 2006.

MATALLO, M. B. et al. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, p. 987-994, 2009. Número especial.

MAUCH-MANI, B.; SLUSARENKO, A. J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 203-212, 1996.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. Oxford: Oxford University Press, 1994. 545 p.

MCBRIDE, M.; KUNG, K. H. Complexation of glyphosate and related ligands with iron (III). **Soil Science of America Journal**, Madison, v. 53, p. 1668-1673, 1989.

MENEGHETTI, R. C. **Avaliação do fosfito de potássio sobre o progresso de *Phakopsora pachyrhizi* em soja**. 2009. 65 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

MIANO, T. M. et al. Infrared and fluorescence spectroscopy of glyphosate-humic acid complexes. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 123-124, p. 83-92, 1992.

MILA, I.; SCALBERT, A.; EXPERT, D. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogen and rots. **Phytochemistry**, New York, v. 42, n. 6, p. 1551-1555, 1996.

MITCHELL, C.; ADAMS, J. **Phosphites as fertilizer**. Auburn: Auburn University, Department of Agronomy & Soils, 2004. (Agronomy series: timely information). Disponível em: <<http://www.aces.edu/timelyinfo/Ag%20Soil/2004/May/s-04-04-phosphite.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

MONQUERO, P. A. et al. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.

MORIN, F. et al. Glyphosate uptake in catharanthus roseus cells: role of a phosphate transporter. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 58, p. 13-22, 1997.

MOUSDALE, D. M.; COGGINS, J. R. Amino acid synthesis. In: KIRKWOOD, R. C. **Target sites for herbicide action**. Plenum Press: New York, 1991. p. 29-56.

MUELLER, T. C. et al. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza Canadensis* L. Cronq.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 51, p. 680-684, 2003.

MUSTAFA, N. R.; VERPOORTE, R. Chorismate derived c6c1 compounds in plants. **Planta**, Heidelberg, v. 222, p. 1-5, 2005.

NANDULA, M. N. et al. Glyphosate-resistant and -susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 3540-3545, 2007.

NOJOSA, G. B. de A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. **Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência.** In: CAVALCANTI, L. et al. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.

ORCARAY, L. et al. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. **Pest Management Science**, New York, v. 66, p. 262-269, 2010.

OSSIPOV, V. et al. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. **Biochemical Systematics and Ecology**, Surrey, v. 31, p. 3-16, 2003.

OSSIPOV, V. I.; ALEKSANDROVA, L. P. Effects of glyphosate on metabolism of quinic and shikimic acids in scotch pine needles. **Soviet Plant Physiology**, New York, v. 33, p. 584-589, 1986.

OSSIPOV, V. I.; ALEKSANDROVA, L. P. Spatial organization of quinic and shikimic acid biosynthesis in autotrophic cells of *Pinus sylvestris* needles. **Soviet Plant Physiology**, New York, v. 29, p. 289-292, 1982.

PETERSEN, I. L. et al. Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 89, p. 220-229, 2007.

PINTO, J. E. B. P. et al. Glyphosate induces 3- deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in potato (*Solanum tuberosum* L.) cells grown in suspension culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 87, p. 891-893, 1988.

PLINE, W. A. et al. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and non glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 50, n. 3, p. 506-512, 2002.

POLYA, G. M.; WANG, B. H.; FOO, L. Y. Inhibition of signal-regulated protein kinases by plant-derived hydrolysable tannins. **Phytochemistry**, New York, v. 38, n. 1/2, p. 307-314, 1995.

POPOVA, L.; PANCHEVA, T.; UZUNOVA, A. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. **Bulgarian Journal Plant Physiology**, Sofia, v. 23, n. 1/2, p. 85-93, 1997.

PRATA, F. et al. Glyphosate sorption and desorption in soils with different phosphorous levels. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 1, p. 175-180, 2003.

PRATA, F. et al. Influência da matéria orgânica na sorção e dessorção de glicofosfato em solos com diferentes atributos mineralógicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 35-42, 2000.

QUEIROGA, C. L. Analisadores de massa: QTRAP. In: _____. **Espectrometria de massas: princípios e aplicações**. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/>> Acesso em: 21 dez. 2010.

RADOSEVICH, S. et al. **Weed ecology: implications for management**. 2. ed. New York: Wiley, 1997. 588 p.

RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignifications toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Washington, DC, v. 133, p. 1051-1071, 2003.

RAJCAN, I.; SWANTON, C. J. Understanding maize-weed competition: resource competition, light quality and the whole plant. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 139-150, 2001.

READE, J. P. H.; COBB, A. H. Herbicides: modes of action and metabolism. In: NAYLOR, R. E. L. **Weed management handbook**. Blackwell Science: Oxford, 2002. p. 134-170.

REAM, J. E. et al. EPSP synthase: binding studies using isothermal titration microcalorimetry and equilibrium dialysis and their implications for ligand recognition and kinetic mechanism. **Biochemistry**, Nashville, v. 34, p. 5528-5534, 1992.

REDDY, K. N. et al. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 56, p. 2125-2130, 2008.

REDDY, K. N.; BELLALLOUI, N.; ZABLOTOWICZ, R. M. Glyphosate effect on shikimate, nitrate reductase activity, yield, and seed composition in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 58, p. 3646-3650, 2010.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 52, p. 5139-5143, 2004.

REGITANO, J. B. Sorção e dessorção do glyphosate no solo. In: VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Fepaf: Botucatu, 2009. p. 153-178.

REUVENI, M.; REUVENI, R. Efficacy of foliar sprays of phosphates in controlling powdery mildews in field-grown nectarine, mango trees and grapevines. **Crop Protection**, Surrey, v. 14, n. 4, p. 311-314, 1995.

RIBANI, M. et al. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1156, p. 201-205, 2007.

RIPPERT, P. et al. Engineering plant Shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 92-100, 2004.

ROCHA, T. L. et al. **Metabolômica**: aplicações e perspectivas. Brasília, DF: EMBRAPA, 2006. 38p. (Documentos, n. 189).

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, B. N. **Guia de herbicidas**. Londrina: Edição dos Autores, 2005. 648 p.

RODRIGUES, J. D. **Absorção e transporte de solutos nas plantas**. In: VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Botucatu: Fepaf, 2009. 493 p.

RUUHOLA, T.; JULKINEN-TITO, R. Trade-off between synthesis of salicylicates and growth of micropropagated *Salix petandra*. **Journal Chemistry Ecology**, New York, v. 29, n. 7, p. 1565-1588, 2003.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SALMINEN, J. P. et al. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. **Phytochemistry**, New York, v. 57, p. 15-22, 2001.

SALMINEN, J. P.; OSSIPOV, V.; PIHLAJA, K. Distribution of hydrolysable tannins in the foliage of finish birch species. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tübingen, v. 57, p. 248-256, 2002.

SATICHIVI, N. M. et al. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**, Champaign, v. 48, p. 675-679, 2000.

SCHANBENBERGER, O.; KELLS, J. J.; PENNER, D. Statistical tests for hormesis and effective dosage in herbicide dose-response. **Agronomy Journal**, Madison, v. 91, p. 713-721, 1999.

SCHIMID, J.; AMRHEIN, N. Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 39, p. 737-749, 1995.

SCHULTZ, A. et al. Glyphosate transport and early effects on shikimate metabolism and its compartmentation in sink leaves of tomato and spinach plants. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tübingen, v. 45, p. 529-534, 1990.

SCHULTZ, M. E.; AMRHEIN, N. Glyphosate induced accumulation of shikimic acid in tomato plants in relation to the translocation of glyphosate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 75, p. 37-49, 1984.

SCHULTZ, M. E.; BURSIDE, O. C. Absorption, translocation, and metabolism of 2,4-D and glyphosate in hemp dogbane (*Apocynum cannabinum*). **Weed Science**, Champaign, v. 28, p. 13-20, 1980.

SERVATES, J. C.; TUCCI, M. A.; GEIGER, D. R. Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 2, p. 370-374, 1987.

SHAH, J. The salicylic acid loop in plant defense. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 6, p. 365-371, 2003.

SHIEH, W. J.; GEIGER, D. R.; SERVIATES, J. C. Effect of N-(Phosphonomethyl) glycine on carbon assimilation and metabolism during a simulated natural day. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 3, p. 1109-1114, 1991.

SILVA, D. A. et al. Culturas antecessoras e adubação nitrogenada na cultura do milho, em sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 1, p. 75-88, 2006.

SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v. 12, p. 527-530, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina, 1995. 42 p.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. **Weed Science**, Champaign, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1975.

STEINRUCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid 3- phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 94, p. 1207-1212, 1980.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. **Amino Acids**, Vienna, v. 30, p. 195-204, 2006.

TANNER, G. J. et al. Proanthocyanidin biosynthesis in plants: Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 278, n. 34, p. 31647-31656, 2003.

TEGELEN VAN, L. J. P. et al. Purification and cDNA cloning of isochorismate synthase from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**, Washington, DC, v. 119, p. 705-712, 1999.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 829-833, 2006.

TOWNSON, J. K.; BUTLER, R. Uptake, translocation and phytotoxicity of imazapyr and glyphosate in *Imperata cylindrica*: effect of herbicide concentration, position of deposit and two methods of direct contact application. **Weed Research**, Champaign, v. 30, p. 235-243, 1990.

VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Biochemical basis of herbicide resistance. **Chemistry of Plant Protect**, New York, v. 7, p. 141-169, 1991.

VELINI, E. D. et al. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, New York, v. 64, p. 489-496, 2008.

VELINI, E. D. et al. Growth regulation and other effects of herbicides. **Weed Science**, Champaign, v. 58, p. 351-354, 2010.

VELINI, E. D. et al. Modo de ação do glyphosate. In: VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Fepaf: Botucatu, 2009. 493 p.

WAGNER, R.; KOGAN, M.; PARADA, A. M. Phytotoxic activity of root absorbed glyphosate in corn seedlings (*Zea mays* L.). **Weed Biology and Management**, Kyoto, v. 3, p. 228-232, 2003.

WANAMARTA, G. D.; PENNER, D. Foliar absorption of herbicides. **Weed Science**, Champaign, v. 4, p. 215-231, 1989.

WANG, C. Y. Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, Champaign, v. 15, p. 628-635, 2001.

WARD, E. R. et al. Coordinate gene activity in response to agents than induce systems acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

WEBER, A. P. M.; SCHWACKE, R.; FLUGGE, U. I. Solute transporters of the plastid envelope membrane. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 133-164, 2005.

WHITE, A. K.; METCALF, W. W. Microbial metabolism of reduced phosphorous compounds. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 61, p. 379-400, 2007.

WILDERMUTH, M. C. et al. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. **Nature**, London, v. 44, p. 562-571, 2001.

YOSHIDA, S.; TAZAKI, K.; MINAMIKAWA, T. Occurrence of shikimate and quinic acids in angiosperms. **Phytochemistry**, Oxford, v. 14, p. 195-197, 1975.