

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

**METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE EFEITOS
FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS DO GLUFOSINATE EM SOJA**

LUIS RODRIGO MIYAMOTO BARBERIS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – *Campus* de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia
(Agricultura)

BOTUCATU – SP

Maio – 2012

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

**METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE EFEITOS
FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS DO GLUFOSINATE EM SOJA**

LUIS RODRIGO MIYAMOTO BARBERIS

Orientador: Prof. Dr. Caio Antônio Carbonari

Co-orientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – *Campus* de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia
(Agricultura).

BOTUCATU – SP

Maio – 2012

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

B234m Barberis, Luis Rodrigo Miyamoto, 1975-
Metodologia para determinação de efeitos fisiológicos e metabólicos do glufosinate em soja / Luis Rodrigo Miyamoto Barberis. - Botucatu : [s.n.], 2012
v, 66 f. : il., gráfs. color., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012
Orientador: Caio Antônio Carbonari
Co-orientador: Edivaldo Domingues Velini
Inclui bibliografia

1. Intoxicação. 2. Plantas - Efeitos dos herbicidas. 3. Soja - Fisiologia. 4. Soja - Metabolismo. 5. Toxinas microbianas. I. Carbonari, Caio Antônio. II. Velini, Edivaldo Domingues. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

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

TÍTULO: METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE EFEITOS FISIOLÓGICOS
E METABÓLICOS DO GLUFOSINATE EM SOJA

ALUNO: LUIS RODRIGO MIYAMOTO BARBERIS

ORIENTADOR: PROF. DR. CAIO ANTONIO CARBONARI
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI
CO-ORIENTADORA: PROFª Dra ANA CATARINA CATANEO

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. CAIO ANTONIO CARBONARI



PROF. DR. FERNANDO TADEU DE CARVALHO



PROF. DR. MARCUS BARIFOUSE MATALLO



PROF. DR. CLEBER DANIEL DE GOES MACIEL



PROFª DRª ELZA ALVES CORRÊA

Data da Realização: 16 de maio de 2012.

A meus pais, Luiz Gonzaga Barberis e Ione Miyamoto Barberis
A meus sogros, Regina Aparecida Mattana e José Carlos Mattana
A minha madrinha Maria de Lourdes Barberis

pelos exemplos de vida em família, apoio e carinho.

OFEREÇO

A Profa. Dr^a Raquel Souza Mattana

*Pelo amor incondicional, apoio
e confiança em meu potencial.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado sabedoria e coragem para obtenção do título de Doutor.

Ao Prof. Dr. Caio Antônio Carbonari, pela orientação, dedicação e participação ativa em todas as fases do Doutorado, da implementação ao fechamento do projeto.

A Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, pela co-orientação, suporte técnico-científico, e incomensuráveis contribuições ao longo de todo trabalho.

Aos colegas do NUPAM, Roselaine Araldi, Giovanna L. G. C. Gomes, Leandro Tropaldi, Natália Corniani, Lucas Perim, Marcelo Giroto, Ilca Puertas, Marcella Guerreiro de Jesus, e aos amigos da TechField, Marcelo Rocha Corrêa e Eduardo Negrisoni, pelos bons momentos de convívio e colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos de campo e laboratório, Luiz Marcelo Siono, José Guilherme Cordeiro em especial ao Químico José Roberto Marques Silva pelas preciosas colaborações durante a realização dos experimentos laboratoriais.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia / Agricultura, da Faculdade de Ciências Agronômicas, pela oportunidade e formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos concedida.

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

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO.....	1
2 SUMMARY.....	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
4.1 Controle de plantas daninhas em soja.....	7
4.2 Glufosinate de amônio.....	10
4.3 Mecanismo e modo de ação do glufosinate.....	13
4.3.1 Inibição da fotossíntese.....	17
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5.1 Desenvolvimento formulação do glufosinate de potássio.....	22
5.2 Tratamentos Testados.....	22
5.2.1 Experimento I: Quantificação dos compostos em diferentes períodos.....	22
5.2.2 Experimento II: Efeitos de diferentes doses das duas formulações do glufosinate.....	22
5.3 Desenvolvimento das metodologias analíticas.....	23
5.3.1 Extração e quantificação de amônia.....	23
5.3.2 Desenvolvimento do método cromatográfico.....	24
5.3.3 Extração de compostos.....	26
5.4 Avaliação da etr e fitointoxicação.....	27
5.5 Análise dos resultados.....	27
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1 Resultados do Desenvolvimento do Método Cromatográfico.....	28
6.2 Resultados do teste de extração de amônia.....	31
6.3 Extração dos compostos.....	32
6.4 Experimento I: Quantificação dos compostos em diferentes períodos.....	36
6.4.1 Quantificação de amônia.....	36
6.4.2 Quantificação dos demais compostos.....	38
6.5 Experimento II: Efeitos de diferentes doses das duas formulações do glufosinate.....	44

6.5.1 Quantificação de amônia.....	44
6.5.2 Quantificação dos demais compostos.....	45
6.6 Etr e fitointoxicação.....	50
7 CONCLUSÕES.....	58
8 REFERÊNCIAS.....	59

1 RESUMO

O glufosinate é derivado do fosfinotricina, uma toxina microbiana natural isolada a partir de duas espécies de fungos *Streptomyces*. Atua inibindo a atividade da enzima glutamina sintetase, que é necessária para a produção do aminoácido glutamina e para a desintoxicação da amônia pela planta. Objetivou-se neste trabalho avaliar a intoxicação e alterações fisiológicas e bioquímicas causadas pelo glufosinate em plantas de soja. 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 cultivar de soja Nidera NS 7100 (RR) plantada em vasos de cinco de litros de solo. Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro experimento instalado com os seguintes tratamentos: duas formulações (glufosinate de amônio a 2,5 L p.c. ha⁻¹ e glufosinate de potássio 2,5 L p.c. ha⁻¹), três períodos de coleta de folhas dois, quatro e seis dias após aplicação e um tratamento testemunha sem aplicação. O segundo experimento foi instalado com os seguintes tratamentos: duas formulações (glufosinate de amônio e glufosinate de potássio), três doses de cada produto (0,625 L p.c. ha⁻¹; 1,25 L p.c. ha⁻¹; 2,5 L p.c. ha⁻¹) e um tratamento testemunha sem aplicação. As variáveis analisadas em ambos os experimentos

foram, amônia, compostos pertencentes à rota metabólica de ação do glufosinate (glutamato, glutamina, serina, ácido aminolevulênico, glufosinate), análise visual de fitotoxicidade e ETR (taxa de transporte de elétrons). Para determinação de amônia foram desenvolvidas metodologias de extração para posterior quantificação em espectrofotômetro. Para determinação dos compostos, foram realizados testes de extração para escolha da metodologia mais apropriada, e desenvolvimento dos métodos analíticos em LC-MS/MS (cromatografia líquida e espectrometria de massas). As avaliações de fitointoxicação foram baseadas em critérios visuais e as medições de ETR se deram por meio de um fluorômetro portátil. Para o experimento de períodos foram observados incrementos nos níveis de glutamato, serina, ácido aminolevulênico nos maiores períodos de avaliação, para o glufosinate foram observados decréscimos nas concentrações nos maiores períodos e para glutamina houve redução nas concentrações em relação à testemunha em todos os períodos. Para o experimento de doses, foram observados incrementos nos teores glutamato, serina, ácido aminolevulênico para ambas as formulações em relação à testemunha. Para o glutamato os maiores aumentos foram observados na dose de 1,25 L ha⁻¹ para a formulação de sal de potássio; para a glutamina houve decréscimo nas concentrações para ambas as formulações em relação à testemunha em todas as doses; para o glufosinate foram observadas concentrações proporcionais às doses e foram observados níveis mais elevados para a formulação de sal de potássio. Para a formulação de base de potássio a dose de 2,5 L ha⁻¹ promoveu uma maior fitointoxicação e para a formulação de amônia a maior fitointoxicação foi observada para as doses de 1,25 e 2,5 L ha⁻¹. Foram observadas nas plantas, concentrações proporcionais às doses de glufosinate aplicados para ambas as formulações.

2 SUMMARY

METHODOLOGY FOR DETERMINING METABOLIC AND PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF GLUFOSINATE IN SOYBEAN. Botucatu, 2012, 66 p. Tese (Doutorado em Agronomia / Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LUIS RODRIGO MIYAMOTO BARBERIS

Adviser: Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI

Co-adviser: Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

The glufosinate is derived from phosphinothricin, a natural microbial toxin isolated from *Streptomyces* of two species of fungus. Acts inhibits the activity of glutamine synthetase, which is necessary for the production of the amino acid glutamine and for the detoxification of ammonia by the plant. The objective of this study was to evaluate the toxicity and physiological and biochemical changes caused by glufosinate in soybean plants. The experiment was carried out in green-house, in Faculty of Agronomic Sciences at São Paulo State University. We used soybean the cultivar NS 7100 Nidera planted in vases containing 5 liters of soil. Two experiments were carried out, the first experiment set with the following treatments: two formulations (glufosinate ammonium 2.5 L c.p. ha⁻¹ and glufosinate potassium

2.5 L c.p. ha⁻¹), three periods of leaf collection two, four and six days after application and a control without application. The second experiment was carried out with the following treatments: two formulations (glufosinate ammonium and glufosinate potassium), three doses of each product (0.625 L c.p. ha⁻¹, 1.25 L c.p. ha⁻¹, 2.5 L c.p. ha⁻¹) and a control without application. The variables analyzed in both experiments were ammonia, compounds belonging to the metabolic pathway of action of glufosinate (glutamate, glutamine, serine, aminolevulinic acid, glufosinate), visual analysis of plant injury and ETR (electron transport rate). To determine the ammonia were developed extraction methodologies for a quantification in spectrophotometric and for determination of compounds, extraction tests were performed to choose the most appropriate methodology, and development of analytical methods in LC-MS/MS (liquid chromatography and mass spectrometry). Plant injury evaluations were based on visual criteria and ETR measurements are given by a portable fluorometer. For the experiment periods were observed increases in levels of glutamate, serine, aminolevulinic acid in longer periods of assessment for the glufosinate were observed decreases in the concentrations and for longer periods in glutamine concentrations were reduced compared to control at all times. For the experiment of doses were observed increases in glutamate levels, serine, aminolevulinic acid for both formulations when compared to control. For glutamate highest increases were observed at the dose of 1.25 L ha⁻¹ for the formulation potassium salt; for glutamine concentrations were decreased for both formulations when compared to the control at all doses; to glufosinate were observed proportional concentrations to the doses and still high level was observed for the formulation of the potassium salt. To the base formulation of potassium, dose of 2.5 L ha⁻¹ promoted a greater plant injury and in the formulation of ammonia greater plant injury was observed for the doses of 1.25 and 2.5 L ha⁻¹. Plants were observed in concentrations proportional to the doses of glufosinate applied to both formulations.

Key words: Ammonium glufosinate, potassium glufosinate, soybean

3 INTRODUÇÃO

Os herbicidas devem ser usados de forma técnica e criteriosa, sempre buscando maximizar as suas vantagens e minimizar os seus riscos toxicológicos e ambientais. A sua utilização não é isenta de riscos, como os resíduos dos herbicidas nos agroecossistemas e a toxicidade para plantas suscetíveis utilizadas como culturas sucedâneas à cultura tratada. Entre tantas espécies de plantas, algumas tem sido alvo de grandes discussões, entre elas, a soja. São inúmeras as características que colocam em foco esta espécie, seja pelo seu pleno aproveitamento, ou ainda, pelas possibilidades de investimento financeiro e retorno econômico. Traçar as características morfológicas, genéticas, ecofisiológicas bem como seus potenciais de desenvolvimento diante de alterações bioquímicas, tem se tornado necessário para todos os setores que estão envolvidos com a cultura da soja.

As moléculas herbicidas conhecidas atuam na fisiologia da planta, uma vez que, dependendo do seu mecanismo de ação o herbicida reconhece o sítio de ação e atua inibindo enzimas responsáveis pela produção de compostos secundários vitais para o desenvolvimento da planta. O emprego dos chamados inibidores metabólicos podem causar em situações específicas acúmulo ou redução nos níveis de substâncias precursoras à formação de compostos ligados ao metabolismo primário ou secundário na planta podendo ser um exemplo da inter-relação de genética química com o uso de herbicidas. Em setores como o de

matologia, fisiologia de plantas cultivadas e da bioquímica vegetal, o estudo dos diferentes mecanismos de ação, bem como o modo de ação, estão sendo intensificados ao longo das últimas décadas e, tal fato, pode ser justificado por fatores que variam desde o aumento na demanda na utilização de defensivos agrícolas ou por fatores benéficos da utilização de tais compostos nas plantas.

O uso intensivo de defensivos agrícolas, mais especificamente da classe dos herbicidas tem gerado discussões que envolvem aspectos positivos e negativos da utilização desses compostos químicos para o ambiente e, em específico, para a humanidade, onde se coloca em evidência o potencial de produção das plantas para o sustento da população mundial em contraposição aos prejuízos à saúde dos seres vivos. Por outro lado, a fitotoxicidade causada pelos herbicidas nas culturas, algumas vezes considerada como um estresse momentâneo e de absoluta recuperação das plantas, mas em outras é capaz de causar prejuízos a cultura de interesse e ao meio ambiente.

Partindo dessas premissas objetivou-se neste trabalho avaliar a intoxicação e alterações fisiológicas e bioquímicas causadas pelas formulações do glufosinate em plantas de soja.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Controle de Plantas Daninhas em Soja

A soja (*Glycine max* L.) é a cultura de maior área de plantio no Brasil e conseqüentemente de maior importância econômica para o país a medida que é responsável pela exportação de grãos e de derivados. No contexto das grandes culturas produtoras de grãos, a soja foi a que mais cresceu em termos percentuais nos últimos 37 anos, tanto no Brasil quanto em nível mundial. De 1970 a 2007, o crescimento da produção global foi da ordem de 500% (de 44 para 220 milhões de toneladas), enquanto as produções de culturas como trigo, arroz, milho, feijão, cevada e girassol cresceram, no máximo, uma terça parte desse montante (DALL'AGNOLL; HIRAKURI, 2008).

Segundo Petter et al. (2007) um fator agravante, que onera o custo de produção da soja é o alto consumo de herbicidas visando minimizar os efeitos das plantas daninhas. Com o advento do cultivo de variedades de soja transgênica, tolerantes ao herbicida glyphosate, a aplicação deste herbicida se intensificou ainda mais nas lavouras brasileiras, chegando a ser realizada até quatro aplicações anuais desse produto.

Os herbicidas atuam sobre sistemas enzimáticos ou proteínas específicas das plantas alterando sua funcionalidade. As rotas em que atuam os herbicidas

devem ser fundamentais para o crescimento e desenvolvimento vegetal, pois o seu bloqueio deve promover a paralisação do crescimento ou a morte das plantas.

No sistema de manejo convencional de solo, no momento do plantio, as plantas daninhas presentes por ocasião do preparo do solo são controladas mecanicamente pelos implementos que realizam os cultivos. No plantio direto esse trabalho é, geralmente, realizado por herbicidas dessecantes para evitar a competição com a cultura (ROMAN; DIDONET, 1990). Segundo Almeida (1991), o êxito do plantio direto dependerá da disponibilidade de herbicidas que sejam eficazes nas operações de manejo ou dessecação e após a instalação da cultura. O manejo ou dessecação antecedendo o plantio direto é fundamental para um bom desenvolvimento das lavouras. A eliminação das plantas daninhas antes da semeadura permite que a cultura tenha um desenvolvimento inicial rápido e vigoroso.

O glufosinate de amônio tem um papel bastante importante na dessecação das plantas daninhas antes do plantio da soja, principalmente em áreas com a presença de plantas daninhas resistentes ao glyphosate, como por exemplo a buva (*C. bonariensis*).

A buva (*Conyza canadensis* e *C. bonariensis*) está entre as dez principais espécies de plantas daninhas distribuídas ao redor do mundo (TRAINER et al. 2005), infestando mais de 40 diferentes culturas, sendo relatadas perdas significativas de rendimento em culturas como beterraba, videira, cebola e cenoura (LAZAROTO et al. 2008). Segundo Bruce e Kells (1990), uma densidade de 150 plantas de *C. canadensis* por metro quadrado, reduziu em 83% o rendimento de grãos de soja, cultivada no sistema de semeadura direta. Devido estar presente em culturas tão distintas, esta espécie está predisposta a desenvolver resistência à herbicidas de diferentes mecanismo de ação, o que dificulta muito o seu manejo. O uso intenso de glyphosate em sistemas de produção de frutíferas e na cultura da soja transgênica tolerante a este herbicida favoreceu a seleção de biótipos resistentes de *C. bonariensis* e *C. canadensis* (VIDAL et al. 2007). O primeiro relato de biótipos de *C. canadensis* resistentes ao glyphosate ocorreu nos Estados Unidos (VANGESSEL, 2001). Steckel et al. (1997) mostraram que a eficácia do glufosinate em plantas daninhas anuais varia com a idade e o estágio de desenvolvimento no momento do tratamento. Em um estudo realizado sobre o potencial de rebrota plantas daninhas perenes, após o tratamento com glufosinate ou glyphosate, o número de novos rebentos viáveis foi de até 30 vezes maior em

glufosinate que o glyphosate em *Cirsium arvense* (L.) e 2,5 vezes maior em *Apocynum cannabinum* L. (WELCH; ROSS 1997). A eficácia do glufosinate em plantas daninhas perenes é limitada devido a este herbicida apresentar menor atividade sistêmica que glyphosate (BROMILOW et al. 1993).

No Brasil, foram confirmados casos de resistência de biótipos *C. bonariensis* e *C. canadensis* ao herbicida glyphosate nos Estados do Rio Grande do Sul (VARGAS et al. 2007; LAMEGO; VIDAL, 2008) e São Paulo (MOREIRA et al. 2007).

Segundo Ferreira et al. (2010) atualmente, em função da resistência da buva ao glyphosate, os agricultores visando sucesso no controle da mesma, tem utilizado a aplicação de misturas com diferentes herbicidas. Ainda segundo o autor, uma opção que tem demonstrado bons resultados é a aplicação sequencial, onde se efetua a primeira aplicação em torno de 10 a 15 dias antes da semeadura e no momento da semeadura se efetua uma segunda aplicação visando complementar o controle. Esta segunda aplicação, usualmente tem sido feita com herbicidas com ação de contato como glufosinate de amônio.

Além da resistência dos biótipos de buva ao glyphosate, outro fator que interfere muito no manejo desta espécie é o estágio de desenvolvimento das plantas no momento da aplicação (KOGGER et al. 2004). Oliveira Neto et al. (2010) avaliaram a influencia do estágio de desenvolvimento de buva na eficácia do glufosinate de amônio e verificaram que o estágio da *C. bonariensis* no momento da aplicação afeta significativamente a do glufosinate de amônio (400 g i.a. ha⁻¹). Segundo Patel et al. (2010), quanto mais avançado o estágio de desenvolvimento das plantas de *C. bonariensis* no momento da implantação da cultura da soja, maiores serão as perdas de rendimento de grãos, devido a dificuldade de manejo destas plantas. Vangessel et al. (2009) avaliaram a interação entre doses de glyphosate e o estágio de desenvolvimento da buva (biótipo resistente) e observaram que em plantas jovens os níveis de controle são melhores. Segundo Moreira et al. (2010), quanto mais avançado o estágio das plantas de buva maior a ocorrência de brotações laterais após a aplicação dos tratamentos.

Constantin e Oliveira (2005) ressaltaram que aplicações sequenciais, onde são aplicados antecipadamente herbicidas sistêmicos, tais como glyphosate e, após 15 a 20 dias, na véspera ou na data da semeadura são aplicados herbicidas de contato, proporcionam maior eficiência no controle das plantas daninhas e permitem a semeadura no

limpo. A segunda aplicação serve fundamentalmente para corrigir problemas de rebrotes e novos fluxos de plantas já emergidas por ocasião da semeadura, já que de acordo com esses autores, o primeiro fluxo que emerge no verão é normalmente o de maior densidade e o que tem maior potencial de prejudicar o rendimento das culturas, uma vez que emerge antes ou junto com a cultura. Uma vantagem adicional do uso do glufosinate de amônia seria o controle não somente de espécies resistentes mas também de espécies de plantas daninhas de mais difícil controle pelo glyphosate como a trapoeraba (*Commelina benghalensis*) e a corda-de-violão (*Ipomoea grandifolia*).

4.2 Glufosinate de amônio

O glufosinate é um herbicida de amplo espectro, utilizado para controlar uma grande variedade de plantas daninhas em pós emergência, sendo também utilizado como dessecante. O glufosinate é um sal de amônio, derivado do fosfinotricina, uma toxina microbiana natural isolada a partir de duas espécies de fungos *Streptomyces*. Este produto é um ácido contendo fósforo amino. Atua inibindo a atividade da enzima glutamina sintetase, que é necessária para a produção do aminoácido glutamina e para a desintoxicação da amônia.

A aplicação de glufosinate leva à redução da glutamina e ao aumento dos níveis de amônia nos tecidos da planta, ocasionando uma redução da fotossíntese e a morte da planta dentro de poucos dias (RASCHE et al. 1995). Segundo Ferreira et al. (2010) o primeiro sintoma da ação do glufosinate de amônio é o amarelecimento da folhagem e outros tecidos verdes da planta, seguido de murchamento e morte da planta, processo que demora 1 a 2 semanas.

O glufosinate de amônio tem sido descrito como um herbicida semi-sistêmico (SCHWERDTLE et al., 1981). O herbicida é principalmente transportado para as pontas da folha com a transpiração no xilema (ANDERSON et al., 1993a). No entanto, em algumas espécies Haas e Mueller (1987), Mersey et al. (1990) e Steckel et al. (1997) observaram translocação de ^{14}C marcado no glufosinate de amônia através do floema para as

raízes. Eles encontraram uma correlação entre a sensibilidade ao herbicida glufosinate de amônio e a taxa de translocação no floema.

A absorção do glufosinate ocorre através das folhas e caules e os danos estão restritos às partes das plantas que estão em contato direto com o produto. O agente tensioativo aniônico, polioxietileno de sódio alquiléter sulfato (AES), normalmente é adicionado para aumentar a absorção de glufosinate pela planta. O ingrediente ativo pode mover-se dentro das folhas, porém não conhece claramente a translocação para outras partes da planta, tais como rizomas subterrâneos ou estolões. Em plantas perenes, contudo, a quantidade translocada para rizomas pode ser muito importante, tal como indicado pelas experiências de Köcher e Löttsch (1985), que descobriram que o glufosinate inibia o crescimento rebrota de rizomas de *I. cilíndrica*. Haas e Mtiller (1987) relataram que, em estudos de cromatografia em camada fina, de 11 a 13% do [^{14} C] com glufosinate de amônia foi absorvido pelas plantas e metabolizado em 3-MPFA [^{14} C] na parte aérea e 0,2 a 0,6% nas raízes das três espécies estudadas.

A influência de diferentes fatores ambientais sobre a eficácia do glufosinate de amônia tem sido relatada na literatura. Baixas temperaturas (DONN, 1982; LANGELÜDDEKE et al. 1988; MATHIASSEN; KUDSK, 1993), baixa umidade relativa (ANDERSON et al. 1993a; MATHIASSEN; KUDSK, 1993; PETERSEN; HURLE, 2000, 2001) e chuvas até cinco ou seis horas após o tratamento (LANGELÜDDEKE et al. 1988) podem diminuir a eficácia do produto. Queda na radiação fotossinteticamente ativa também podem reduzir a eficácia do glufosinate (KÖCHER, 1983). A influência negativa de baixa temperatura é principalmente, devido à diminuição da atividade metabólica das plantas.

O herbicida glufosinate de amônia é um composto constituído por uma mistura de dois isômeros óticos D e L do composto fosfinotricina, o qual é um dos tripeptídeos de bilanafos. Bilanafos é um bioherbicida sintetizado por *Streptomyces hygroscopicus*, sendo que depois de absorvido pelas plantas é metabolizado em glufosinate e alanina. O isômero L de glufosinate é um herbicida para aplicação em pós-emergência, controlando mono e dicotiledôneas anuais (ROSS; LEMBI, 1985; BÖRGER; SANDMANN, 1989; DEVINE et al. 1993).

O glufosinate tem em sua composição Ammonium 4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]-DL-homoalaninate ou ammonium DLhomoalanin- 4-

yl(methyl) phosphinate (glufosinato-sal de amônio) com 200 g L⁻¹ (20,0% m/v) e ingredientes inertes. O produto comercial tem o nome de Finale e pertencente a classe dos herbicidas não seletivos de ação total do grupo homoalanina substituída tendo tipo de formulação, concentrado solúvel. Apresenta classificação toxicológica I e classificação do potencial de periculosidade ambiental II.

O glufosinate de amônio controla eficientemente, em pós-emergência de jato dirigido, plantas daninhas nas culturas da alface, algodão, banana, batata, citros, café, eucalipto, maçã, milho, nectarina, pêssigo, repolho, soja, trigo e uva. Também é utilizado na dessecação de feijão, batata e soja. Para a cultura da soja é recomendado na dose de 2,5 a 3,0 L ha⁻¹ para controle de mono e dicotiledôneas (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

O conhecimento da estrutura de um herbicida e algumas das suas propriedades físico-químicas, muitas vezes permite uma estimativa de seu comportamento e mecanismo de adsorção. As suas propriedades, tais como acidez ou basicidade (denominado pKa ou PKB), solubilidade em água e tamanho molecular, afetam a adsorção-dessorção por colóides do solo (BAILEY; WHITE, 1970).

O glufosinato de amônio, que tem uma estrutura molecular C₅H₁₅N₂O₄P (Figura 2), tem uma solubilidade em água muito elevada de 1370 g L⁻¹ (BEHRENDT et al. 1990). A sua meia-vida foi determinada em numerosos estudos laboratoriais e varia de 3 a 42 dias em alguns estudos e até 70 dias em outros (BEHRENDT et al. 1990; FABER et al. 1997; TOMLIN, 2000; DEVOS et al. 2008).

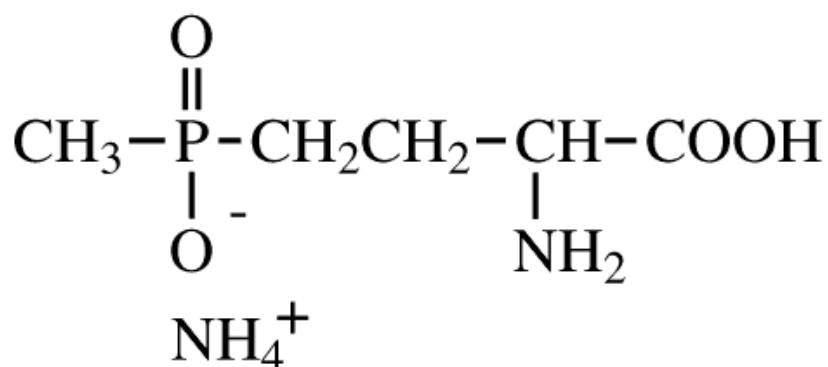


Figura 2. Estrutura da molécula do glufosinate de amônia.

A meia vida mais curta tende para ser em solos com argila e alto teor de matéria orgânica (ISMAIL; AHMAD, 1994). A natureza dos grupos funcionais é um dos fatores que determinam a característica química estrutural de uma molécula de pesticida influenciando assim a sua adsorção pelos colóides do solo e o mecanismo de adsorção. Ambos grupos amino e carbonil que existe na estrutura química do glufosinato podem participar na ligação de hidrogénio. A ligação hidrogênio parece ser o mecanismo mais importante para a adsorção de moléculas orgânicas polares não iônicas, tais como glufosinato em minerais de argila (KHAN, 1980).

Após a sua aplicação, uma grande proporção de glufosinato vai se depositar sobre o solo. A adsorção é um dos fatores mais importantes que afetam o destino de pesticidas no solo e, conseqüentemente, determinam a sua distribuição no sistema solo e água (GILES et al. 1960). O glufosinato de amônio pode ser fortemente adsorvido pelo solo rico em argila e pouco adsorvido em solo com baixo teor de argila (BEHRENDT et al. 1990; JEWELL; BUFFIN, 2001; AUTIO et al. 2004).

Ainda existem poucas informações disponíveis sobre o modo de dissipação do glufosinate no solo. Os ingredientes ativos do glufosinate são altamente estáveis na prateleira, mas são microbiologicamente degradados muito rapidamente no solo. Experiências de campo com glufosinate marcado com carbono 14 mostrou que não existe qualquer translocação em camadas de solo mais profundos do que 15 cm, o que é atribuído a rápida biodegradação (GOETZ et al. 1983.).

Adsorção e bioatividade do herbicida foram correlacionados com a matéria orgânica, teor de argila, e outros parâmetros do solo (WEBER; PETER, 1982). A matéria orgânica foi a superfície primária adsorvente no solo (RAHMAN et al. 1978; WEBER; PETER, 1982; NISHIMOTO; RAHMAN, 1985).

4.3 Mecanismo e modo de ação do glufosinate

O glufosinate de amônia é um inibidor competitivo da enzima glutamina sintetase (GS), inibindo a primeira reação de incorporação de amônia nas células

Especula-se que a ação fitotóxica do glufosinate de amônia decorre de quatro processos: a) acúmulo de amônia nos cloroplastos; b) inibição da enzima rubisco por acúmulo de glioxilato na fotorrespiração devido ausência de transaminação; c) redução de pH do interior do cloroplasto, atrapalhando a síntese de ATP; e d) inibição de redução de nitrato, dependente de luz (ROSS; LEMBI, 1985; BÖRGER; SANDMANN, 1989; DEVINE et al., 1993).

O nitrogênio presente no solo ou fornecido via fertilização é absorvido como amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-) (LEA, 1993). Subseqüentemente, o nitrogênio é incorporado para formar ácido glutâmico por uma seqüência de reações catalisadas por enzimas como glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) e, no caso da absorção ocorrer na forma nítrica, também pela nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR), enzimas que mediam a redução do NO_3^- (LEA, 1993). A maioria destas enzimas é dependente do suprimento de energia via NADPH ou ferridoxina (HUPPE; TURPIN, 1994).

A estimulação do crescimento por doses muito baixas de glufosinate de amônia foi observado em ambas as espécies e foi significativa em *S. viridis*. Um efeito estimulador de doses subletais de glufosinate em proteínas, RNA, e síntese de lípidos em protoplastos de mesófilo de soja foi observado por outros pesquisadores (BELLINDER, et al. 1985).

A assimilação do nitrogênio, juntamente com a de CO_2 , constitui-se na principal função de uma célula foliar. Há evidências de que a principal rota de assimilação do NH_4^+ produzido nos tecidos foliares é sua conversão em glutamina, seguida pela formação de glutamato, em reações mediadas pelas enzimas glutamina sintetase e GOGAT (LAM et al. 1995). A biossíntese e o metabolismo destes e de outros aminoácidos (glicina, serina, alanina, aspartato e asparagina) em plantas estão estreitamente associados com processos fotossintéticos (HUPPE; TURPIN, 1994). A assimilação de nitrogênio em folhas está associada a reações acopladas da GS e GOGAT dependentes de ferridoxina, resultando na incorporação de NH_4^+ em glutamato. A glutamina sintetase é o local primário da assimilação de N, catalisando a reação de NH_4^+ a glutamato e originando glutamina, sendo tal reação potencialmente inibida pelo herbicida glufosinate.

A inibição de glutamina sintetase causa rápido acúmulo nos níveis de NH_4^+ intracelular, associada à ruptura da estrutura do cloroplasto, resultando na inibição da fotossíntese e na morte das células da planta. Embora a toxicidade de NH_4^+ pareça ser o mecanismo de ação primário do glufosinate, NH_4^+ pode não ser a causa principal da morte da célula na presença do inibidor. Além da toxicidade de NH_4^+ , o efeito do herbicida na fotossíntese pode ser explicado pela inibição da síntese de proteínas (especialmente proteína Qb envolvida no transporte de elétrons), pelo acúmulo de glioxalato tóxico, devido à deficiência de aminoácidos doadores ou pela insuficiente regeneração de intermediários do ciclo C_3 (DEVINE et al. 1993; KLECZKOWSKI, 1993).

O papel da GS e GOGAT no processo de transaminação (Figura 1) foi estabelecido na década de 80, através dos trabalhos de Woo e Osmond (1982) e Fentem et al. (1983). Eles vieram substituir o conceito de que a enzima dehidrogenase do glutamato (GDH) era responsável pela maior parte da incorporação do NH_4^+ no ácido aceto glutárico, formando o glutamato.

Em razão da inconsistência dos resultados dos trabalhos com a redutase do nitrato, na procura de associação entre atividade enzimática e capacidade de assimilação de N pelas plantas, foi levantada a hipótese de que a atividade das enzimas glutamina sintetase e GOGAT estaria mais relacionada a essa capacidade.

O pressuposto foi que os genótipos eficientes no uso do nitrogênio são aqueles que têm alta capacidade de incorporar o íon amônio em aminoácidos, através das enzimas glutamina sintetase e GOGAT. Assim, Machado et al. (1992) demonstraram uma alta correlação entre a atividade da enzima glutamina sintetase e a produção de grãos de genótipos de milho. Esse e outros trabalhos indicaram que a determinação da atividade da enzima glutamina sintetase poderia ser utilizada como um parâmetro auxiliar na seleção de genótipos mais eficientes na utilização do nitrogênio.

É importante destacar que existe variabilidade genética para essa característica (MACHADO et al. 1992; MAGALHÃES et al. 1993). O uso generalizado desse parâmetro, no entanto, fica limitado pelo fato de que a assimilação do amônio em aminoácidos só é limitante quando somente essa forma de nitrogênio é suprida às raízes e/ou quando a quantidade absorvida excede a capacidade assimilatória da planta (HARPER, 1994).

Diferenças na tolerância ao glufosinate de amônio entre as espécies foram explicadas em termos de taxa e extensão de absorção e/ou a translocação do herbicida (ACASTER; WEITZMAN, 1985; KÖCHER; LÖTZSCH, 1985) e/ou na capacidade das espécies para desintoxicar ou inativar o herbicida (ACASTER; WEITZMAN, 1985; HAAS; MUELLER, 1987). A cevada foi significativamente mais tolerante ao glufosinate de amônia que *Setaria viridis* em todas as fases de crescimento. Em cevada, os sintomas de lesão progrediram das pontas da folha na direcção da base das folhas, ao passo que em *S. viridis* a lesão foi desenvolvida ao longo de toda a folha em um padrão relativamente uniforme. As plantas de cevada recuperaram mais rapidamente de doses subletais de glufosinate de amônia.

4.3.1 Inibição da Fotossíntese

O modo de ação do glufosinate de amônio se dá através da inibição da glutamina sintetase (LEASON et al. 1982). O que prejudica a fotossíntese (SAUER et al. 1987; WILD et al. 1987), causando alterações na troca gasosa e emissão de fluorescência da clorofila do plantas tratadas (LACUESTA et al. 1992), e conduzindo à morte da célula da planta. Lacuesta et al. (1992) descreveu o efeito de glufosinate de amônio na fluorescência da clorofila em folhas tratadas de cevada (*Hordeum vulgare* L.). Os autores descreveram uma diminuição na fluorescência máxima momentânea, bem como uma diminuição na extinção de fluorescência sob condições fotorrespiratórias após um tratamento com glufosinato.

A extinção de fluorescência foi demonstrada como sendo proporcional ao rendimento quântico do fotossistema II (GENTY et al. 1989). Um baixo rendimento quântico após a aplicação glufosinato indica que menos energia está disponível para a fotossíntese e a energia que não é usada pela planta é perdida como calor ou luz de fluorescência. Sendo assim, a fluorescência da clorofila acaba servindo como um método de quantificação do efeito de glufosinato sobre a planta.

Depois da absorção pela célula da planta, o glufosinate de amônia causa efeitos nos processos metabólicos de assimilação de nitrato e na fotorrespiração. Como um análogo estrutural de glutamato, glufosinate de amônia, inibe a glutamina-sintetase (uma enzima chave que controla a utilização de nitrogênio no interior das células) (LEASON et al. 1982; COETZER; AL-KHATIB, 2001). Isto resulta em um rápido aumento no conteúdo de amônia (WILD; MANDERSCHIED, 1984; LEA et al. 1984; COETZER; AL-KHATIB, 2001)

e, subsequentemente, um deslocamento no espectro de aminoácidos das células vegetais (LEA et al., 1984; SAUER et al, 1987). Assim, os parceiros da reação de fotorrespiração importantes são removidos, a fotorrespiração é bloqueada, e a reação de luz da fotossíntese é deprimida (SAUER et al. 1987; WILD et al. 1987; LACUESTA et al. 1992). Coetzer e Al-Khatib (2001) descreveram uma rápida inibição da taxa fotossintética e um aumento na condutância estomática duas horas após a aplicação glufosinato. Seis horas após a aplicação do glufosinato a taxa fotossintética em *Amaranthus palmeri* S. Watson foi reduzido em 63%.

A relação inversa entre a fluorescência da clorofila e fotossíntese é a razão pela qual a medição de fluorescência da clorofila é um método eficaz e rápido para avaliar a eficácia de herbicidas, cujo modo de ação envolve a inibição da fotossíntese (GENTY et al. 1989). A fluorescência da clorofila é um método rápido, que é amplamente utilizado para monitorizar e quantificar a contaminação do ambiente por herbicidas (KLEM et al. 2002).

Sob condições fotorespiratórias relacionadas ao tratamento com glufosinate, Lacuesta et al. (1992), determinaram uma redução na máxima fluorescência momentânea extinguindo as reações fotoquímicas da fluorescência, sendo essa redução proporcional ao rendimento quântico do fotossistema II.

A absorção de ^{14}C -glufosinato mostrou-se muito rápida, ocorrendo durante as primeiras horas após a aplicação (STECKEL et al. 1997; PLINE et al. 1999). Esta rápida adesão explica a rápida redução do rendimento quântico do fotossistema II após a aplicação do herbicida glufosinate de amônio para plantas daninhas crucíferas observadas. Doses superiores a 400 g i.a. ha⁻¹ causou uma forte diminuição no rendimento quântico do fotossistema II. No período de curto prazo, o rendimento quântico de *S. loeselii* tratada com 900 g i.a. ha⁻¹ de glufosinate de amônia, diminuiu para quase zero, nas mesmas condições experimentais. A mesma reação foi encontrada para *S. officinale*, *S. altissimum* e *D. Sophia* indicando que o efeito de glufosinate de amônia foi semelhantes nas plantas daninhas crucíferas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação com temperatura média de 26 a 28° C e umidade relativa de 60 a 80% no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia - NUPAM, pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, campus de Botucatu/SP.

Foram cultivadas plantas de soja (Nidera NS 7100 RR tratada com fungicida Standac 70 ml.40 Kg⁻¹) em vasos de cinco litros do substrato Bioplant (material orgânico de origem vegetal e vermiculita expandida) com pH 5,7 ($\pm 0,5$), previamente adubado com 08-28-16 para que o desenvolvimento das plantas não fosse limitado pela deficiência nutricional com base nas recomendação de calagem e adubação da cultura. Foi realizado um desbaste, deixando-se três plantas por vaso, o que permitiu biomassa para as avaliações realizadas. As plantas foram mantidas em bancadas sob condições plenas de luz em casa-de-vegetação antes e após as aplicações.

A aplicação do herbicida nos diferentes experimentos foi realizada com um pulverizador estacionário (Figura 3) equipado com uma barra de pulverização

constituída por quatro pontas XR 110.02, espaçadas de 0,5 m e posicionadas a 0,5 m de altura em relação às plantas. Para a aplicação do glufosinate de amônio e do glufosinate de potássio, o sistema foi operado com velocidade de deslocamento de 1 m s^{-1} , o que corresponde a 45,0 Hertz no modulador de frequência, com consumo de calda correspondente a 200 L ha^{-1} . O equipamento foi operado com pressão constante de 1,5 bar, por meio de ar comprimido.



Figura 3. Pulverizador utilizado no experimento.

Foram realizados dois experimentos com delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial com quatro repetições. No momento da aplicação, em todos os experimentos, as plantas testadas estavam com o quarto trifólio, já emitido e aproximadamente 45 cm de altura (Figura 4).



Figura 4. Detalhe das plantas no momento da aplicação.

A análise para quantificação da amônia foi realizada segundo protocolo de Petersen e Hurlle (2000), utilizando-se colorimetria pela ação de reagentes e determinação via espectrofotômetro. A metodologia de extração foi desenvolvida no laboratório com o objetivo de recuperar toda amônia da folha, tendo esta análise grande importância na discussão dos resultados com base nos diferentes tipos de produtos aplicados (glufosinate de amônio e glufosinate de potássio), relacionado aos diferentes períodos de coleta das folhas.

Foram desenvolvidos métodos em um sistema LC-MS/MS para determinação dos compostos (glutamato, glutamina, glicina, serina, glioxalato, ácido aminolevulênico e glufosinate). Após a validação dos métodos analíticos a partir dos padrões analíticos dos compostos acima, foi realizado, a quantificação dos diferentes compostos nas amostras de folhas dos dois experimentos. O sistema LC-MS MS apresenta resposta uniforme a grupos de compostos com características similares, mantendo uma relação aproximadamente constante entre a intensidade de sinal (área do pico cromatográfico) e a concentração dos diferentes compostos expressas em unidades molares. Também foram realizados testes de extração destes compostos das folhas utilizando diferentes proporções de solventes.

5.1 Desenvolvimento da formulação do glufosinate de Potássio

Uma formulação de glufosinate de potássio foi desenvolvida em função da necessidade de esclarecimento do mecanismo de acúmulo de amônio na planta. Para tanto foi utilizado uma alíquota de 100 ml do produto comercial Finale para 1000 ml de água chegando-se a concentração de 10% v/v da formulação original do produto. Foi corrigido o pH=13,00 com KOH (Hidróxido de Potássio) em capela com ventilação forçada para que a volatilização ocorresse de forma espontânea após a adição do KOH. Após 24 horas constatou-se que o produto estava sem a presença da amônia analisando-se uma amostra do produto e quantificando-se a amônia presente na mesma. Foi ajustado o pH=7,0 para a formulação de glufosinate do potássio. Após este procedimento o glufosinate presente na formulação foi quantificado por cromatografia e espectrometria de massas, comprovando que não ocorreram perdas do herbicida durante o preparo da formulação.

5.2 Tratamentos Testados

5.2.1. Experimento I: Quantificação dos compostos em diferentes períodos

O primeiro experimento foi instalado com os seguintes tratamentos: duas formulações (glufosinate de amônio a 2,5 L p.c. ha⁻¹ e glufosinate de potássio 2,5 L ha⁻¹) x três períodos de coleta de folhas (2 DAA; 4 DAA; 6DAA) + testemunha sem aplicação com quatro repetições. Objetivou-se neste ensaio verificar em qual período de tempo (dias após aplicação) às aplicações das formulações glufosinate de amônio e glufosinate de potássio melhor responderam às variáveis, acúmulo ou redução de amônia; acúmulo ou redução dos principais compostos estudados (glutamato, glutamina, glicina, serina, glioxalato, ácido aminolevulênico e glufosinate) e análise visual de fitotoxicidade.

5.2.2. Experimento II: Efeitos de diferentes doses das duas formulações do glufosinate

Para o segundo experimento foram testados os seguintes tratamentos: duas formulações (glufosinate de amônio e glufosinate de potássio) x três doses de cada produto ($0,625 \text{ L ha}^{-1}$; $1,25 \text{ L ha}^{-1}$; $2,5 \text{ L ha}^{-1}$) + testemunha sem aplicação com quatro repetições. A partir dos resultados do primeiro experimento, objetivou-se neste ensaio verificar os efeitos de diferentes doses do glufosinate nas duas formulações nas variáveis estudadas, acúmulo de amônia e dos seguintes compostos glutamato, glutamina, serina, ácido aminolevulênico e glufosinate e análise visual de fitotoxicidade.

5.3 Desenvolvimento das metodologias analíticas

5.3.1 Extração e quantificação de Amônia

Foi instalado um experimento prévio em casa de vegetação para se verificar o tempo de extração de amônia com base em períodos de tempo de banho de ultrassom. Foi realizado nas mesmas condições descritas para os dois experimentos já descritos. Foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições com a aplicação das 2 formulações (glufosinate de amônio a $2,5 \text{ L ha}^{-1}$ e glufosinate de potássio a $2,5 \text{ L ha}^{-1}$).

A metodologia de extração foi desenvolvida no laboratório com o objetivo de recuperar toda a amônia das folhas. Com base neste princípio, foram utilizadas garrafas de poliestireno de 300 mL, previamente tratadas, com água acidificada a $\text{pH}=3,5$ com HCl como recipiente para as folhas, coletando-se todas as folhas de cada planta por repetição. A biomassa coletada foi determinada por diferença de peso. Aos dois dias aplicação dos tratamentos. As folhas coletadas foram submetidas a banho de ultrassom por diferentes períodos de tempo 15', 20', 60', 120'. A amônia foi determinada por espectrofotometria segundo o método de Petersen e Hurle (2000) modificado. Todas as determinações foram realizadas no comprimento de onda de 630 nm.



Figura 5. Sequência de coleta das folhas para extração da amônia.

5.3.2 Desenvolvimento do Método Cromatográfico

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 (RIBANI et al. 2007; LANÇAS, 2004). Desta forma foi desenvolvido um método analítico no Laboratório de Cromatografia do NUPAM para quantificação dos seguintes compostos: glufosinate, ácido aminolevulênico, glutamato, glutamina e serina.

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 6), composto por um Cromatografo Liquido 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, autoinjeter 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 do tipo triplo quadrupolo.



Figura 6. Cromatógrafo Liquido (Proeminence UFLC) acoplado ao espectrômetro de massas (3200 Q TRAP) LC-MS/MS. Botucatu/SP, 2012.

As condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização positivo estão apresentadas nas Tabelas 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização positivo.

Coluna Analítica	Synergi 2,5 μ Fusion RP 100 Å
Fase Móvel	Fase A 5 mM acetato de amônio em água Fase B 5 mM acetato de amônio em metanol
Gradiente	0 - 1 minutos: 50% Fase A e 50% Fase B 1 - 4 minutos: 5% Fase A e 95% Fase B 4 - 6 minutos: 5% Fase A e 95% Fase B 6 - 8 minutos: 50% Fase A e 50% Fase B 8 - 10 minutos: 50% Fase A e 50% Fase B
Fluxo	0,4 ml.min ⁻¹

5.3.3 Extração dos demais compostos

A fim de se verificar a quantidade total extraída dos compostos glufosinate, ácido aminolevulênico, glutamato, glutamina e serina, foi instalado um experimento para testar cinco diferentes tipos de soluções extratoras com base na polaridade das moléculas de interesse.

O experimento apresentou as mesmas condições já descritas anteriormente quanto às plantas e aplicação do herbicida (2,5 L ha⁻¹). Alíquotas de 0,1g de cada amostra em triplicata foram maceradas com Nitrogênio líquido e transferidas para tubos falcon com 10 ml das seguintes soluções extratoras: 100% H₂O; 100% Metanol; 50% H₂O:50% H₂O; 25% H₂O:75% Metanol e 75%H₂O:25% Metanol, sendo levadas para banho em ultrassom por 30'. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado com filtro milipore 0,2 μ m análise em LC/MS/MS.

5.4 Avaliação da ETR e Fitointoxicação

Foram realizadas avaliações do fluxo de transporte de elétrons (ETR) no fotossistema II após coleta dos tratamentos no experimento I e II (2 DAA, 4 DAA e 6 DAA). O aparelho utilizado nessa avaliação foi um fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS 5p – Opti Sciences), com leituras realizadas em triplicatas localizadas no 3º trifólio (do mais novo para o mais velho).

As avaliações de fitointoxicação com base nas notas visuais (0 plantas saudáveis e 100% planta morta) foram realizadas somente por um avaliador nos experimentos I e II aos dois, quatro e seis dias após a aplicação (DAA), essa avaliação serviu como acompanhamento visual e para possível correlação dos dados de fitointoxicação com os dados de intoxicação pelo acúmulo de amônia.

5.5 Análise dos Resultados

Para os resultados das concentrações dos compostos avaliados ($\mu\text{g g}^{-1}$) em todos os experimentos, foi estabelecido o intervalo de confiança pelo teste t student's 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.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Resultados do Desenvolvimento do Método Cromatográfico

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.

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. A massa molecular e os fragmentos gerados a partir de cada molécula estão apresentados na Tabela 2. O fragmento utilizado para quantificação de cada um dos compostos foi sempre o primeiro apresentado na Tabela 2, para cada composto. A detecção e separação dos compostos foram realizadas em uma corrida e os tempos de retenção dos compostos retidos pela coluna cromatográfica foram: glutamina (1,44 minutos), glutamato (1,30 minutos), glufosinate (1,27 minutos), serina (1,30 minutos), ácido aminolevulênico (1,29 minutos). As Figuras 7 e 8 representam os

cromatogramas de padrões analíticos de alguns compostos, nas condições descritas anteriormente.

Tabela 2. Massa molecular e íons secundários dos compostos analisados.

Compostos	Massa Molecular	Íons Secundários (Fragmentos)
Serina	106,034	60,1 88,2 69,9
Glufosinate	182,146	136,0 56,0 119,2
Glutamato	148,147	84,1 130,1 56,1
Glutamina	147,170	84,1 130,1 56,2
Ácido Aminolevulêncio	132,213	114,2 86,1 55,1

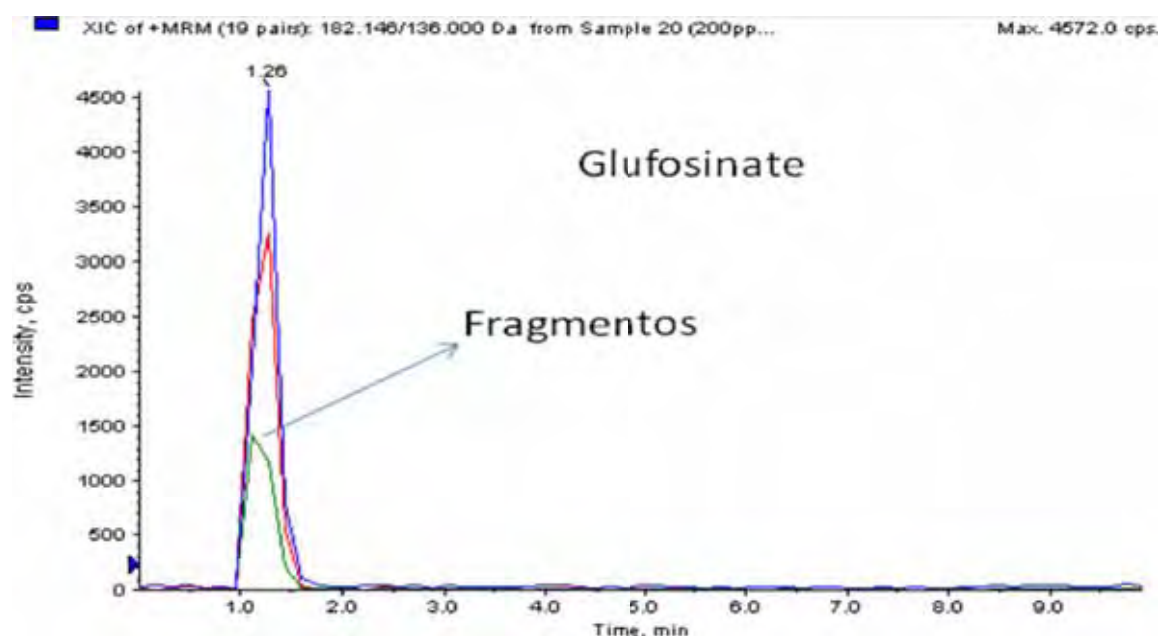


Figura 7. Cromatogramas do glufosinate com os respectivos fragmentos na concentração de 200 ng ml^{-1}

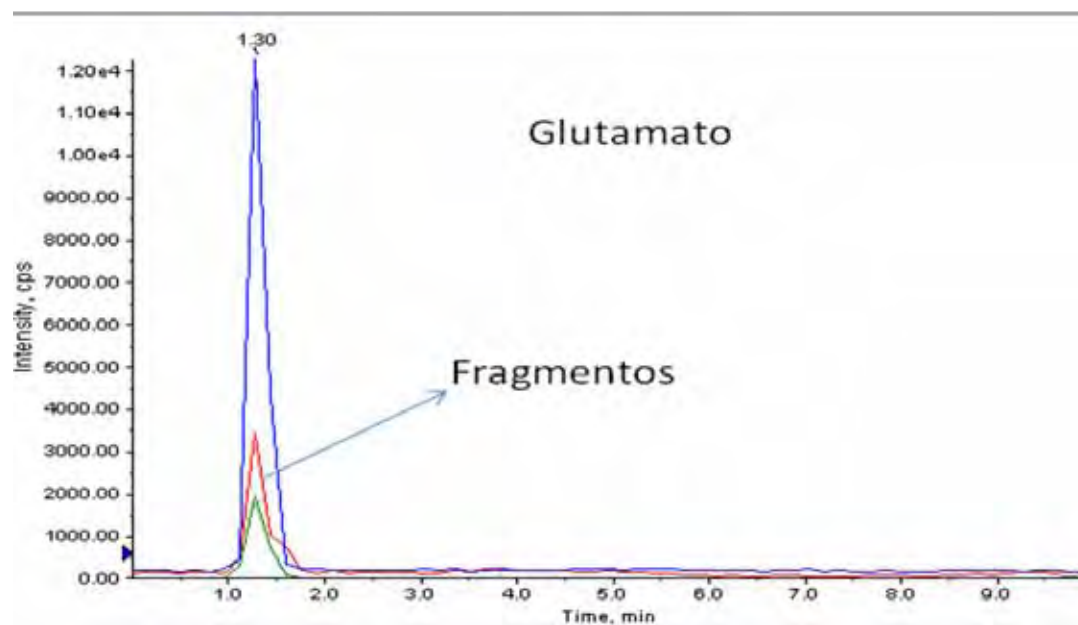


Figura 8. Cromatogramas do glutamato com os respectivos fragmentos na concentração de 200 ng ml^{-1}

Tabela 3. Curvas analíticas e faixas de concentração para cada composto analisado. Botucatu/SP, 2012.

Compostos	Equação da reta	R ²	Intervalo linear (ng.ml ⁻¹)
Glutamato	$y = 874 \cdot x + 653$	0,9965	3,125 – 200
Glutamina	$y = 9,6 \cdot 10^3 \cdot x + 6,16 \cdot 10^3$	0,9953	3,125 – 200
Serina	$y = 357 \cdot x + 2,35 \cdot 10^3$	0,9999	3,125 – 200
Glufosinate	$y = 369 \cdot x + 731$	0,9991	3,125 - 200
Ac. aminolevulênico	$y = 5,29 \cdot 10^3 \cdot x + 1,55 \cdot 10^3$	0,9967	3,125 - 200

6.2 Resultados do Teste de Extração de Amônia

De acordo com a Figura 9 os resultados de extração de amônia para ambos os compostos, glufosinate de amônia e de potássio, demonstraram que o período de extração, com base na metodologia com banho de ultra-som em solução aquosa acidificada, foi de 60 minutos. Sendo assim, esse foi o tempo adotado como padrão de extração de amônia para os experimentos I e II.

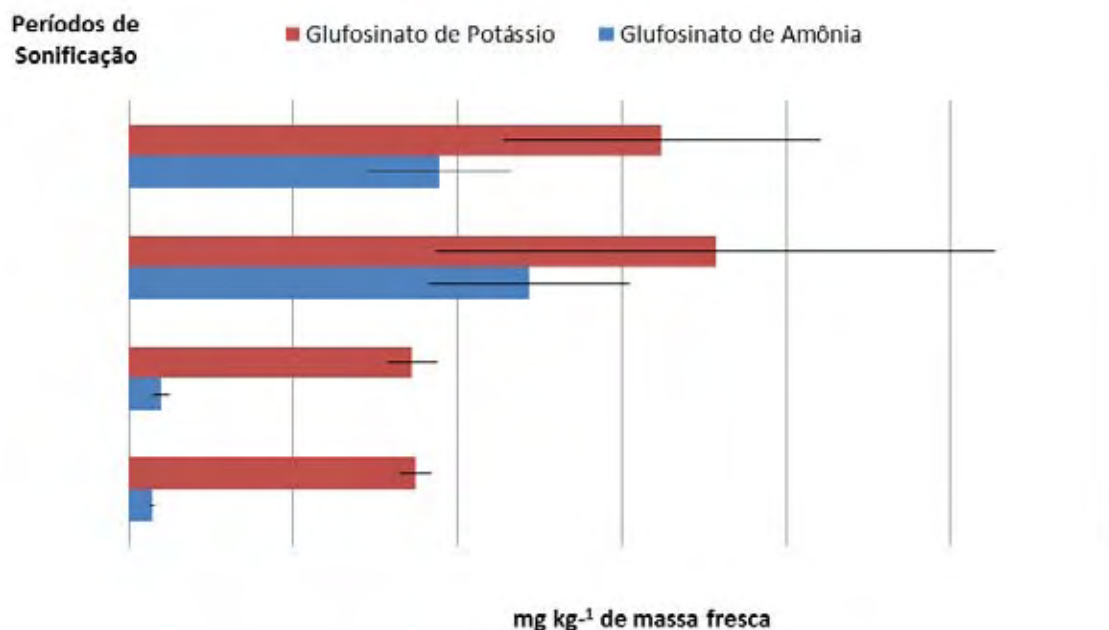


Figura 9. Concentração dos compostos (mg kg⁻¹) na massa fresca de plantas de soja em diferentes períodos de banho de ultra-som. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

6.3 Extração dos compostos

As amostras extraídas foram injetadas nas condições cromatográficas demonstradas na Tabela 1, massas moleculares e íons secundários dos compostos analisados conforme padrões analíticos (Tabela 2) e curvas analíticas e faixas de concentração para cada composto analisado (Tabela 3).

A Figura 10 mostrou que, para o aminoácido glutamina, bons índices de extração foram alcançados com mistura 25% água e 75% metanol, porém, os resultados dos solventes 75% água: 25% metanol, não diferiram significativamente da proporção 75 água e 25 metanol. Portanto adotou-se a solução de 75% água e 25% metanol, principalmente por sua característica mais aquosa.

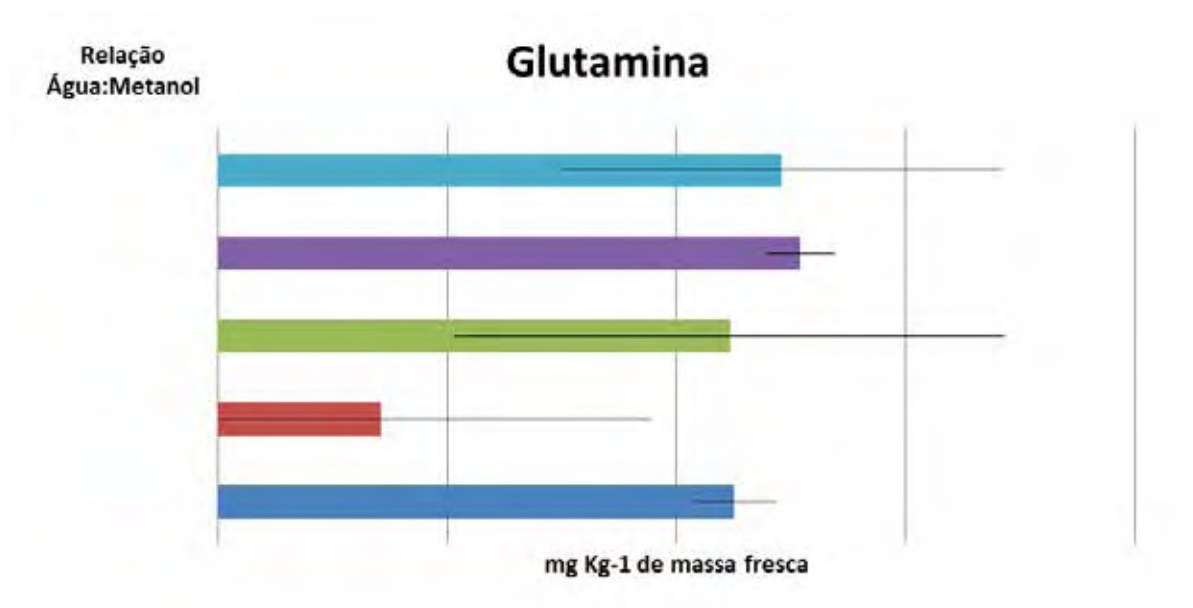


Figura 10. Concentração da glutamina (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes soluções extratoras. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

Na Figura 11, observa-se a afinidade do glutamato pela água, uma vez que as soluções extratoras 75 água e 25 metanol e 100% água, mostrou maiores níveis de recuperação desse composto em relação às demais.

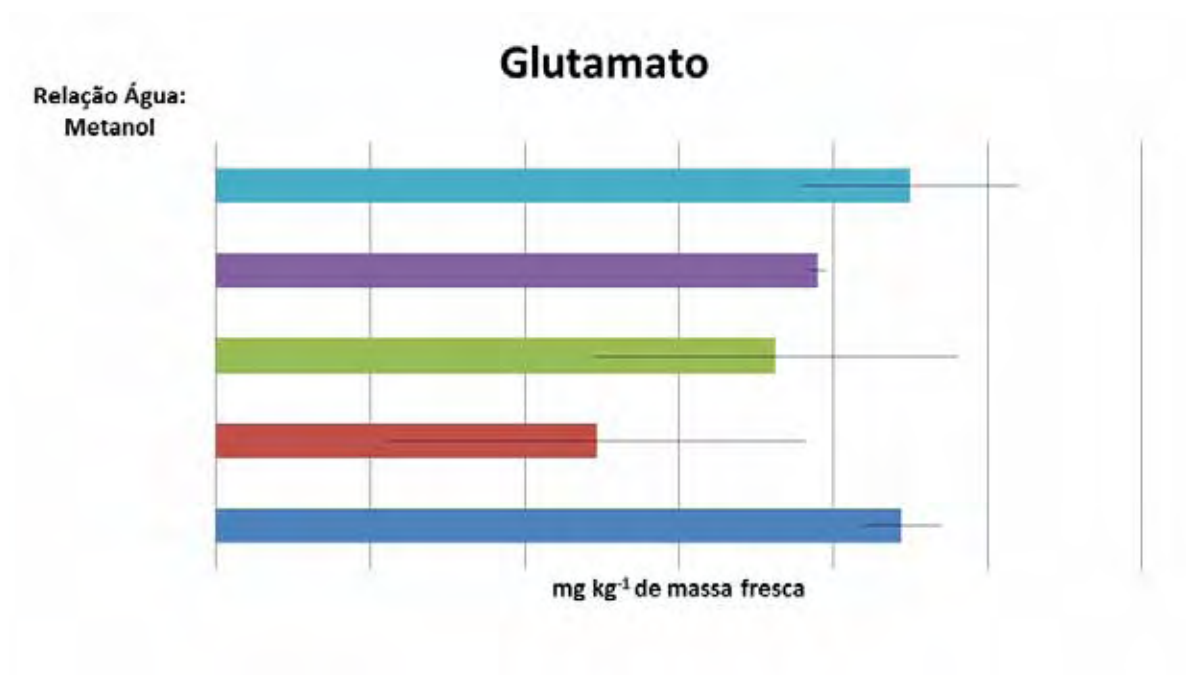


Figura 11. Concentração do glutamato (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes soluções extratoras. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

Na Figura 12, estão apresentados os resultados de extração do glufosinate. Os resultados evidenciam a preferência pela fase extratora de 75% água e 25% metanol, não diferindo significativamente das misturas 50% água e 50% metanol, 100% água; porém com resultados superiores em 8,99% e 19,13%, respectivamente.

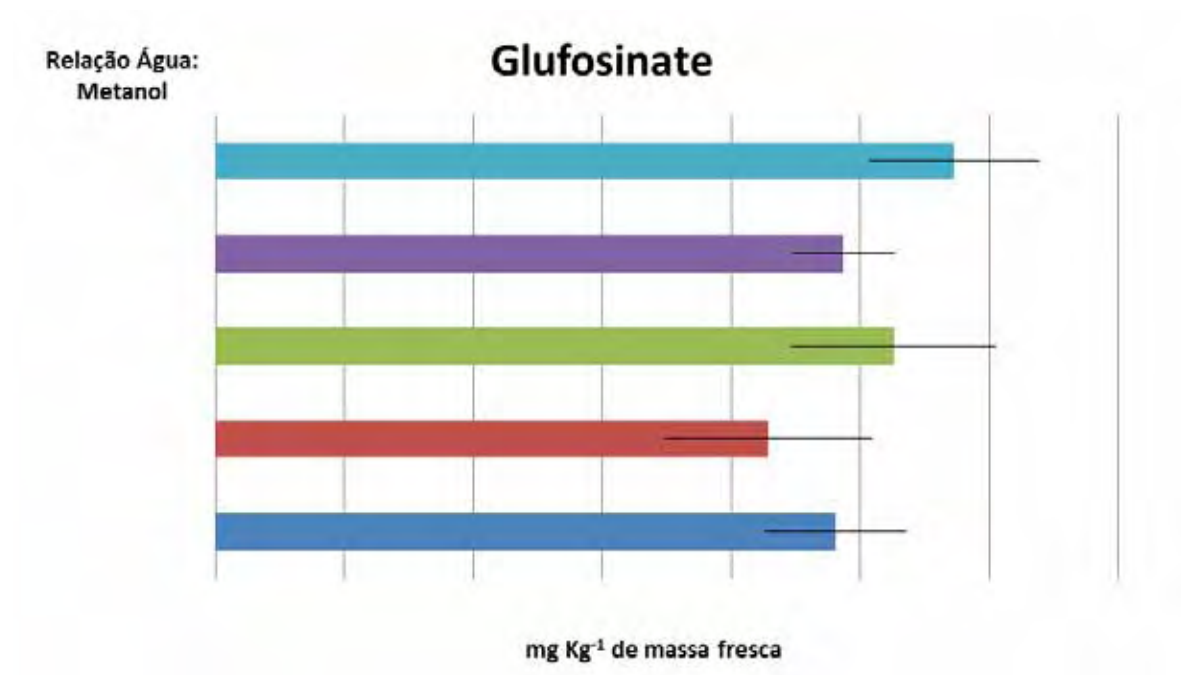


Figura 12. Concentração do glufosinate (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes soluções extratoras. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

A Figura 13 apresenta os resultados dos teores de serina nas plantas. Observam-se bons índices de extração para todas as proporções de água e metanol e somente água, somente o metanol isolado não foi eficiente na extração deste composto.

De acordo com estes resultados apresentados adotou-se a solução de 75% água e 25% metanol, como solução extratora dos compostos a serem estudados em todos os experimentos desenvolvidos.

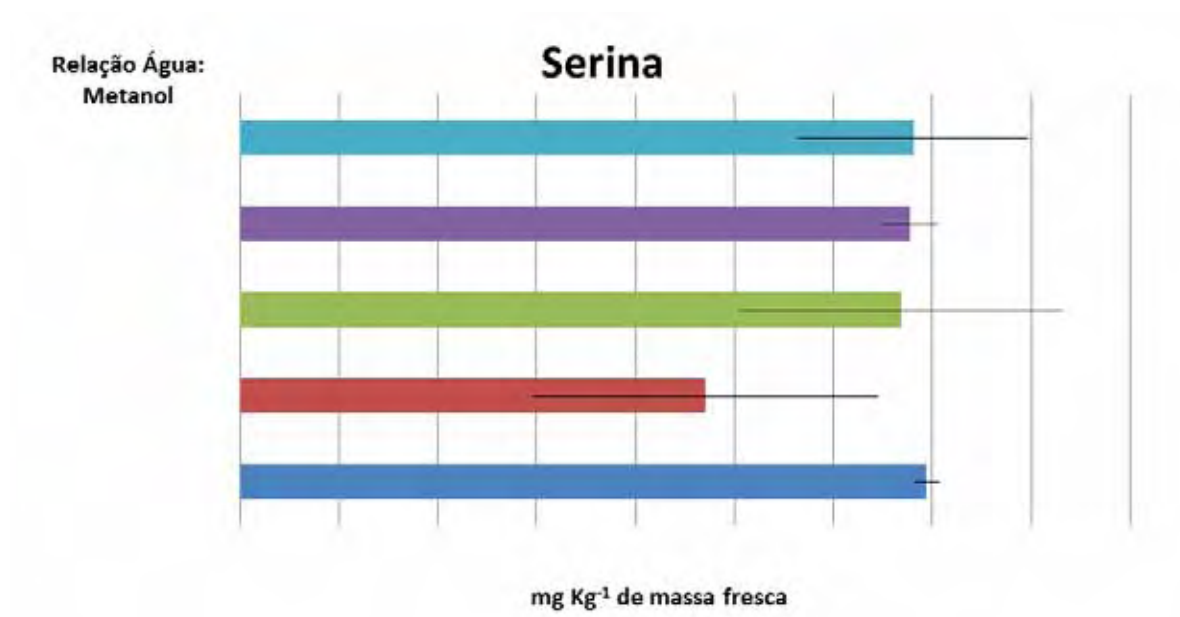


Figura 13. Concentração da serina (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes soluções extratoras. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

6.4 Experimento I: Quantificação dos compostos em diferentes períodos

6.4.1 Quantificação de amônia

A aplicação de glufosinate de amônio nas plantas de soja reduziu significativamente a concentração de amônia aos 4 DAA em relação à concentração observada aos 2 DAA, sem diferir entretanto da concentração observada aos 6 DAA. A aplicação de glufosinato de potássio provocou um aumento não significativo nas concentrações de amônio aos 4 DAA, em relação aquelas observadas aos 2 e 6 DAA.

Observa-se um aumento nas concentrações da amônia da ordem de 50% aos 2, 4 e 6DAA após a aplicação da formulação glufosinato de potássio, demonstrando o potencial de intoxicação das plantas por esse composto quando submetidas a aplicação pela formulação potássica.

Verifica-se que o amônio glufosinate aumentou significativamente a concentração de amônia nas plantas de soja aos 2 DAA, reduzindo significativamente sua

concentração aos 4 DAA, voltando a aumentar aos 6 DAA sem diferir estatisticamente da concentração observada aos 4 DAA. Já a formulação potássica causou acúmulos da ordem de 50% na concentração de amônia, sem entretanto, diferir significativamente aos 2, 4 e 6 DAA.

Aos quatro dias após a aplicação os efeitos tóxicos causados pela amônia proporcionaram um rápido aumento nos níveis de amônia na planta, da ordem de 50 vezes com a formulação glufosinate de amônia e 167 vezes para o glufosinate de potássio, no tratamento 4DAA quando comparados a testemunha. De acordo com a Figura 1, pode-se visualizar que quando inibida a enzima GS1 (sintetase de glutamina citosólica) e GS2 (sintetase de glutamina cloroplasmáticas) ocorre um acúmulo de amônia citosólica e cloroplasmática para folhas novas e folhas velhas, devido à interrupção da reação de amônia na folha com o glutamato (GS1 em folhas velhas no citosol) e na reação da amônia com a glutamato (GS2 e GOGAT em folhas novas no cloroplasto).

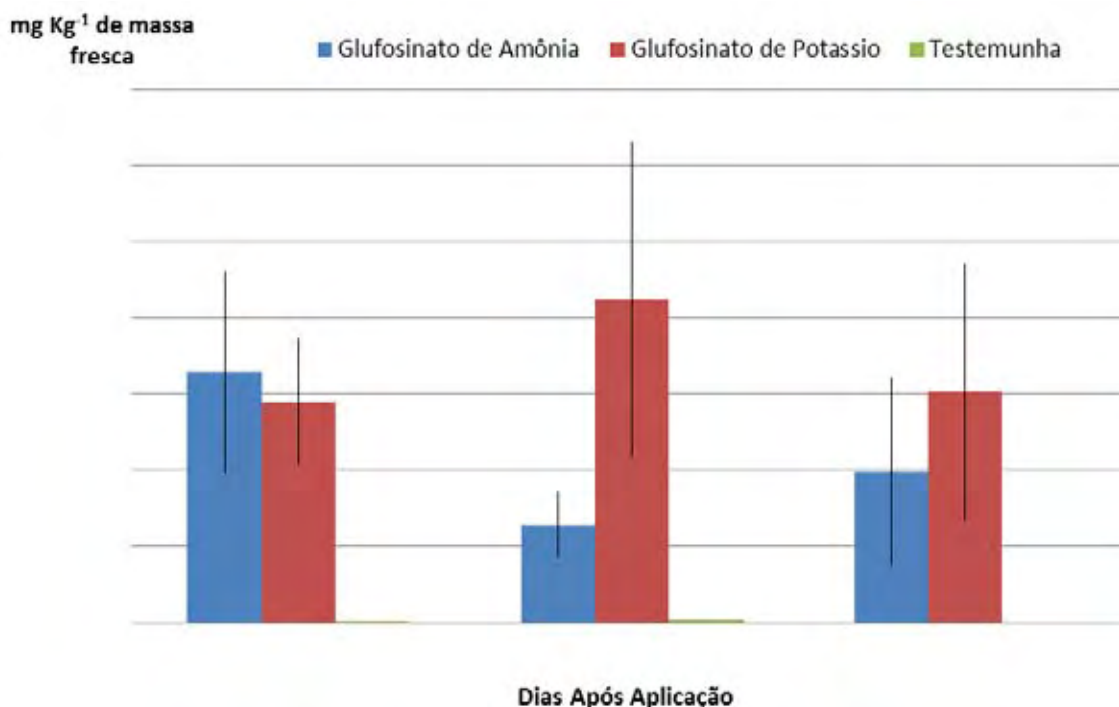


Figura 14. Concentração de amônia (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes períodos, dias após aplicação (DAA). Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

6.4.2 Quantificação dos demais compostos

Na Figura 15, podem ser observadas diferenças significativas de ambas as formulações do glufosinate (amônia e potássio) em relação à testemunha. No entanto, observam-se resultados bastante similares e sem diferenças significativas quanto às alterações deste composto, quando se compararam as formulações de amônia e de potássio.

Em relação aos períodos, são observados aumentos significativos de 2 para 6 DAA para a formulação com sal de amônia. Para a formulação de potássio são observadas diferenças entre o primeiro período (2DAA) e os períodos de 4 e 6 DAA, os quais não apresentaram diferenças significativas.

De acordo com a Figura 1, quando o glufosinate inibe a GS1, primeira reação de incorporação de amônia nas células vegetais (BÖRGER; SANDMANN, 1989; DEVINE et al. 1993), especula-se que a ação fitotóxica do glufosinate de amônia decorre de

quatro processos: a) acúmulo de amônia nos cloroplastos; b) inibição da enzima rubisco por acúmulo de glioxilato na fotorrespiração devido ausência de transaminação; c) redução de pH do interior do cloroplasto, atrapalhando a síntese de ATP; e d) inibição de redução de nitrato, dependente de luz (ROSS; LEMBI, 1985; BÖRGER; SANDMANN, 1989; DEVINE et al. 1993). Normalmente, a enzima GS1 catalisa a reação de amônia e glutamato originando glutamina (Figura 1). Em seguida uma amino-transferase (GOGAT) transfere o grupo amina de glutamina para cetoglutarato originando duas moléculas de glutamato. Uma das moléculas de glutamato é reaproveitada para nova incorporação de amônia, enquanto que a outra molécula de glutamato pode sofrer transaminações com diversos cetoácidos, entre eles o glioxilato, formando aminoácidos e recuperando o cetoglutarato (MATHEWS; HOLDE, 1990). Pode-se verificar que o aumento nos níveis de glutamato observados é explicado pela formação de novas moléculas que “retroalimentam” a rota.

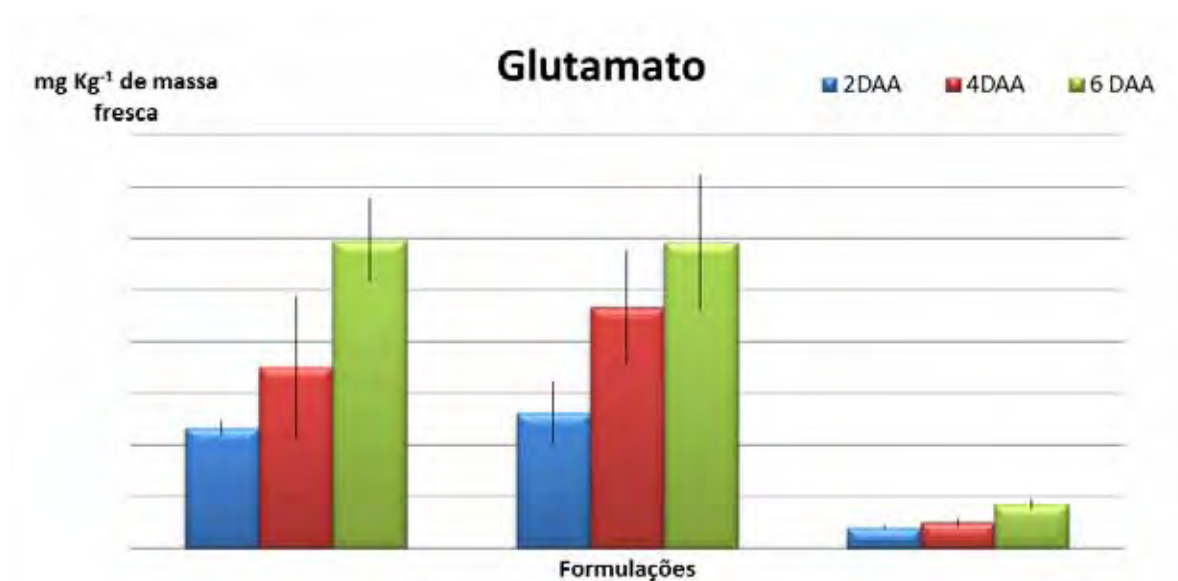


Figura 15. Concentração de glutamato (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes períodos, dias após aplicação (DAA). Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

Na Figura 16, observam-se as concentrações da glutamina e verifica-se que para todos os períodos e formulações ocorreu redução nos níveis desse composto na planta em relação à testemunha. Para a aplicação da formulação com sal de amônia houve uma redução maior nos períodos de 2 e 4DAA e um início de recuperação aos 6DAA. Para a formulação de sal de potássio, a partir de 4DAA houve um aumento nos níveis deste composto.

Os resultados apresentados corroboram com a literatura, uma vez que inibida a GS, a reação entre amônia e glutamato para de ocorrer, ou a velocidade da enzima é diminuída sensivelmente. Esta enzima catalisa a reação de amônia e glutamato originando glutamina (MATHEWS; HOLDE, 1990) e quando a mesma é bloqueada ocorre a ausência dos substratos para a produção da glutamina.

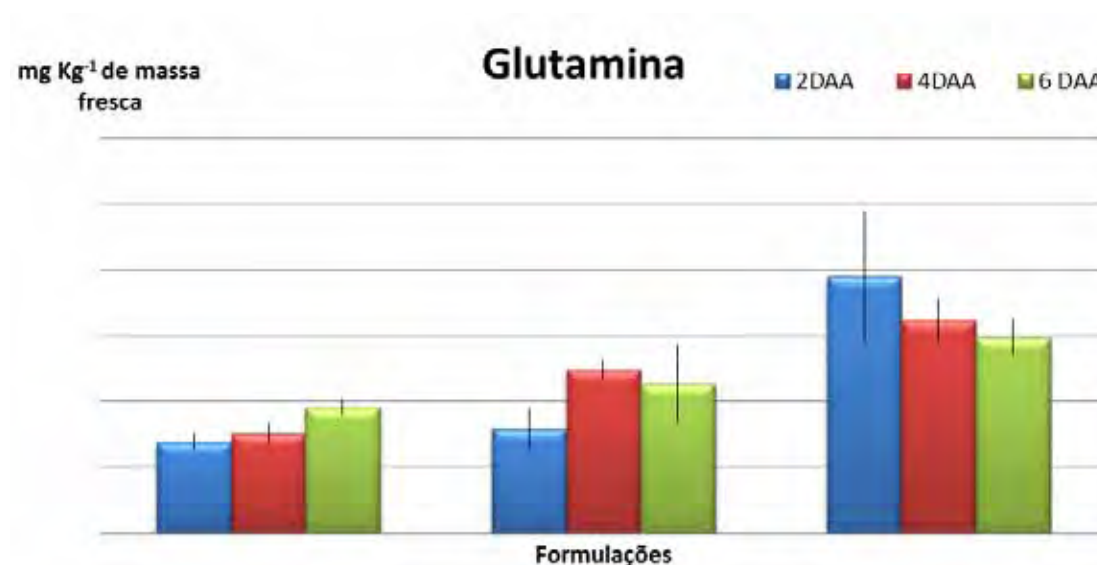


Figura 16. Concentração de glutamina (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes períodos, dias após aplicação (DAA). Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

Na Figura 17, estão apresentados os resultados das concentrações de serina. Observa-se que ambas as formulações promoveram aumentos significativos nos níveis

deste aminoácido nas plantas em relação à testemunha. Não são observadas diferenças significativas entre as duas formulações do glufosinate, sendo que ambas, apresentaram comportamentos bastante similares.

Observa-se em relação aos períodos avaliados, que o maior aumento na concentração do aminoácido ocorreu aos 4DAA, enquanto que aos 6DAA os níveis do composto começam a reduzir. A ação fitotóxica do glufosinate de amônia leva a um processo de inibição da enzima rubisco por acúmulo de glioxilato na fotorrespiração devido ausência de transaminação. O glioxalato é a molécula precursora da glicina, em peroxissomas e mitocôndrias e origina também a serina (MATHEWS; HOLDE, 1990). A serina, por sua vez, pela inibição da rubisco na fotorrespiração no cloroplasto, deixa de ser incorporada ao piruvato-OH, fazendo com que seus níveis aumentem significativamente em relação às plantas saudas.

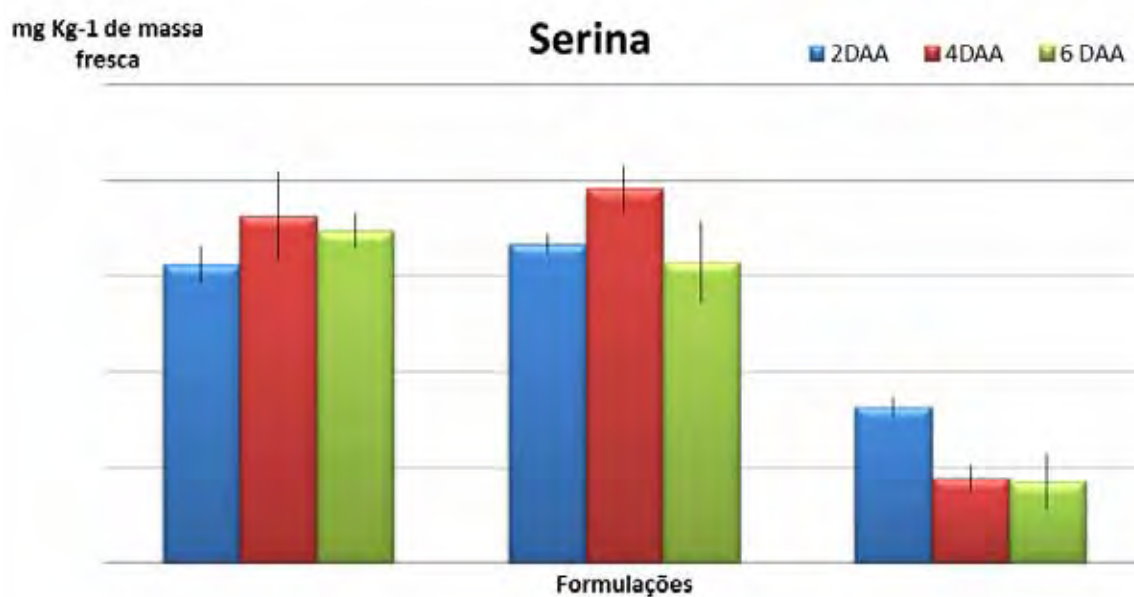


Figura 17. Concentração de serina (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes períodos, dias após aplicação (DAA). Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

Na Figura 18, observam-se os resultados das concentrações do ácido aminolevulênico. Este composto foi encontrado também em maiores concentrações nas plantas tratadas com as duas formulações, sendo os maiores níveis observados no período de 6DAA. Aumentos da ordem de até 2,5 vezes maiores foram verificados, o que reflete os aumentos observados para o glutamato, que é um composto precursor do ácido aminolevulênico, o que contribuiu para uma maior produção deste composto. O glutamato e o ácido aminolevulênico são substratos da rota de formação de protoporfirinas (WATANABE et al. 2001; WELLER, 2002), e desta forma os aumentos de glutamato e do ácido aminolevulênico podem alterar de forma significativa os efeitos de herbicidas inibidores da Protox, uma vez que os níveis de protoporfirinogênio IX podem ser aumentados também. Com base nestes resultados novos estudos podem ser realizados para avaliar a eficácia e os efeitos de misturas de herbicidas inibidores da Protox com o glufosinate de amônio uma vez que existe a possibilidade de efeitos sinérgicos destas duas classes de produtos.

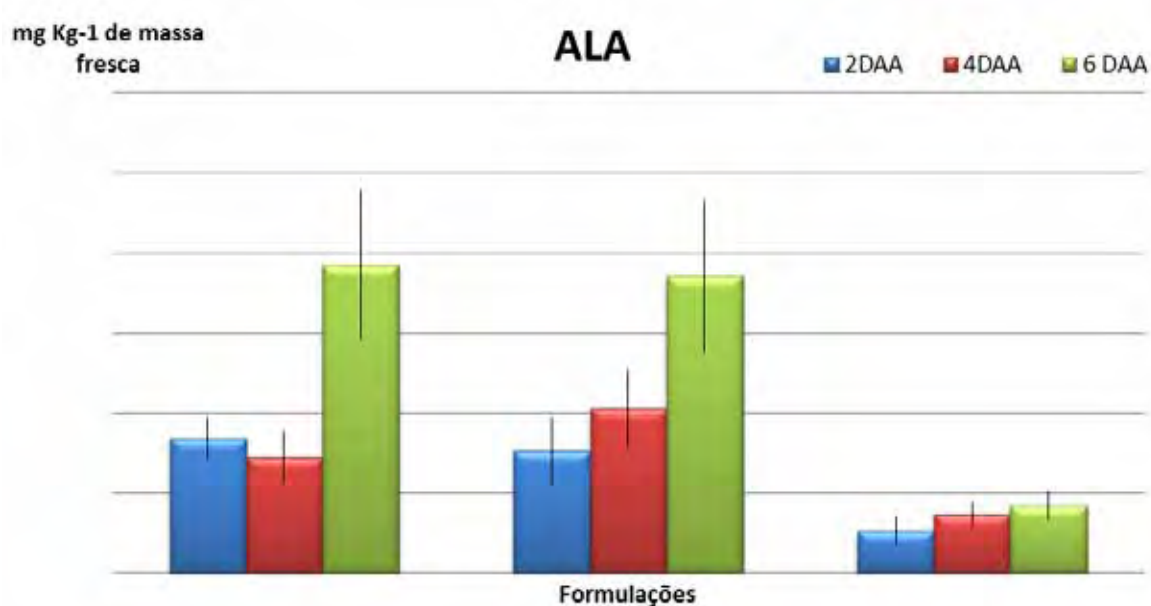


Figura 18. Concentração de ácido aminolevulênico (ALA) (mg kg⁻¹) na massa fresca de plantas de soja em diferentes períodos, dias após aplicação (DAA). Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

Na Figura 19, estão apresentados os resultados das concentrações de glufosinate nas plantas tratadas com as duas formulações. Observa-se que apesar de não serem observadas diferenças significativas, são observados níveis menores do composto nos maiores períodos de avaliação, o que indica uma provável metabolização do glufosinate pelas plantas de soja. Schwerdttle et al. (1981) e descreve o glufosinate como um herbicida semi-sistêmico, com rápida absorção e translocação.

Apesar de não haver diferença estatística, observam-se níveis mais elevados de glufosinate aos 2DAA nas plantas tratadas com a formulação de potássio, o que corrobora com os maiores níveis de amônia observados na Figura 15.

Haas e Mueller (1987), Mersey et al. (1990) e Steckel et al. (1997) observaram translocação de ^{14}C marcado no glufosinate de amônia através do floema para as raízes. Desta forma, como as raízes das plantas não foram analisadas, uma fração do produto pode ter sido translocada promovendo a redução observada nos níveis de composto nos maiores períodos.

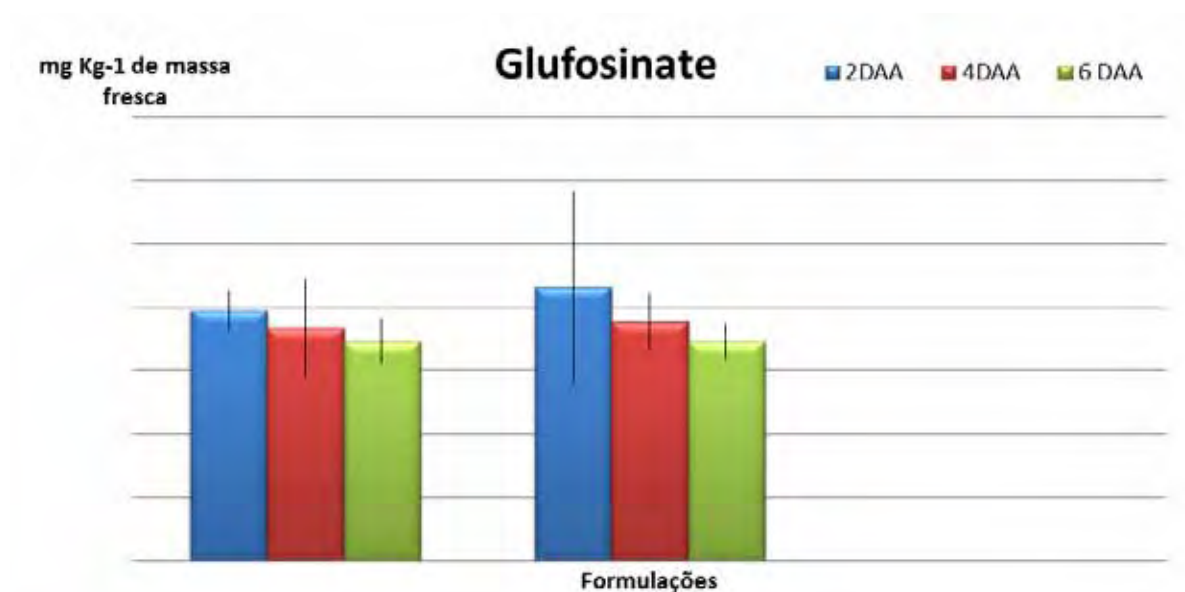


Figura 19. Concentração de glufosinate (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes períodos, dias após aplicação (DAA). Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

6.5 Experimento II: Efeitos de diferentes doses das duas formulações do glufosinate

6.5.1 Quantificação de Amônia

Na Figura 20, estão apresentados os resultados das concentrações de amônia nas plantas para as diferentes doses das duas formulações. Podemos observar que a formulação de glufosinate de amônia apresentou níveis crescentes de amônia nas plantas conforme os aumentos das doses.

Observa-se para as doses $0,625 \text{ L ha}^{-1}$ e $2,5 \text{ L ha}^{-1}$ que, de maneira geral, os acúmulos de amônia foram sensivelmente menores que os acúmulos de amônia para o glufosinate de potássio, evidenciando mais uma vez que esta formulação apresentou maiores níveis de intoxicação das plantas.

O fato da amônia presente na formulação não interferir nas concentrações de amônia das plantas, a caracteriza novamente como um dos principais compostos indicadores da intoxicação das plantas por este herbicida, mesmo para aplicação do glufosinate em baixas doses. O nível de amônia observado nas plantas tratadas, independente de período ou dose, é bastante alto, o que torna este composto tóxico e causa a morte das plantas. Desta forma, apesar de algumas hipóteses sobre a o efeito tóxico da amônia da formulação comercial do glufosinate serem levantadas, pode-se verificar claramente que amônia da formulação não tem papel importante quanto aos efeitos tóxicos nas plantas e tendo somente função na própria formulação do produto.

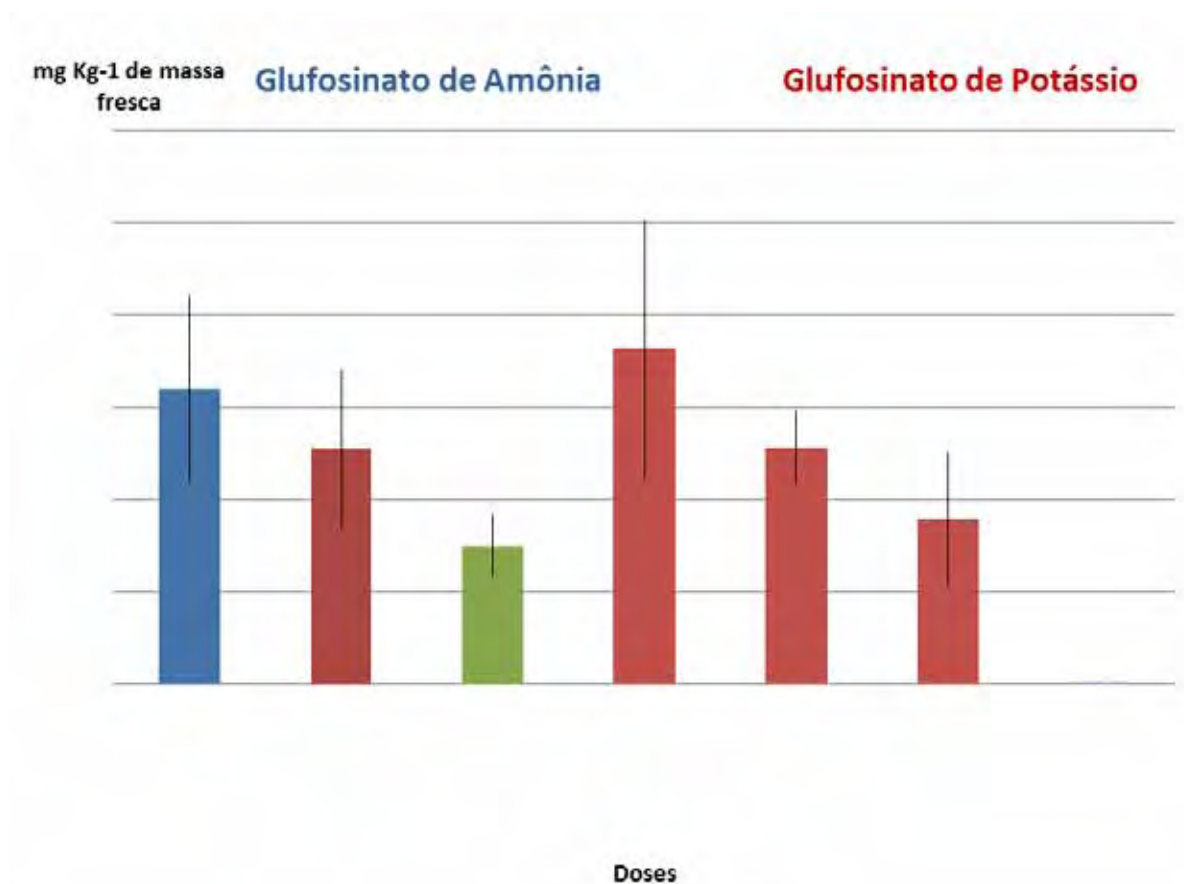


Figura 20. Concentração de amônia (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes doses e formulações. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

6.5.2 Quantificação dos demais compostos

Os resultados demonstraram o efeito de diferentes doses do glufosinate nas duas formulações para os seguintes compostos: glutamato, glutamina, serina, ácido aminolevulênico e glufosinate, quanto ao acúmulo ou supressão, sendo os resultados das concentrações dos mesmos apresentados nas Figuras 22 a 25.

Na Figura 21, observam-se os resultados para o glutamato aos 2DAA, período estabelecido pelo teste de extração de amônia nas folhas. Todas as doses em ambas as formulações responderam significativamente com incremento dos níveis de glutamato em relação à testemunha.

Para o glufosinate de amônia não houve diferença entre as doses, apesar de uma tendência de maior acúmulo para a dose intermediária e para o glufosinate de potássio foram observadas diferenças significativas entre as doses, sendo que a dose de 1,25 L ha⁻¹ foi a que promoveu os maiores incrementos nos níveis de glutamato. Dessa forma, para ambas as formulações, a dose de 1,25 L ha⁻¹ promoveu maiores níveis de glutamato. Um efeito estimulador de doses subletais de glufosinate em proteínas, RNA, e síntese de lípidos em protoplastos de mesófilo de soja foi observado por outros pesquisadores (BELLINDER, et al. 1985). Podemos pré-supor com base neste resultado que a sub-dose utilizada de 1,25 L ha⁻¹, causou o maior incremento do glutamato que é um importante precursor em outras rotas metabólicas primárias e secundárias nas plantas (WATANABE et al. 2001; WELLER, 2002).

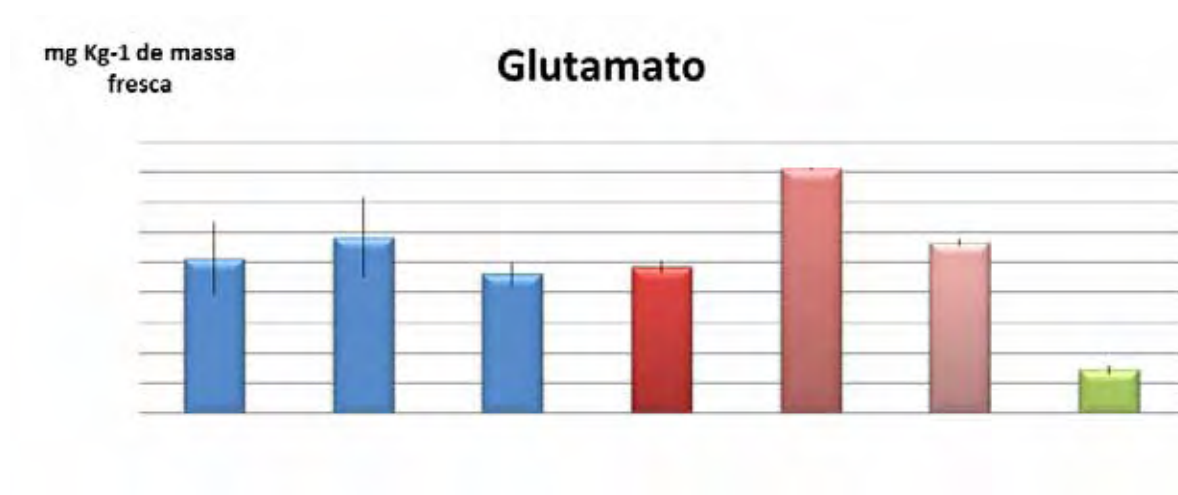


Figura 21. Concentração de glutamato (mg kg⁻¹) na massa fresca de plantas de soja em diferentes doses e formulações. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

Observa-se para as concentrações de glutamina (Figura 22), um comportamento semelhante ao experimento I se compararmos os níveis de glutamina aos 2DAA. Podemos verificar que para todas as doses foram observados níveis inferiores de

glutamina em relação à testemunha. Mais uma vez fica claro que a inibição da GS e consequentemente da reação entre amônia e glutamato para de ocorrer, ou pelo menos a velocidade da enzima é diminuída sensivelmente, o que reduz a produção da glutamina.

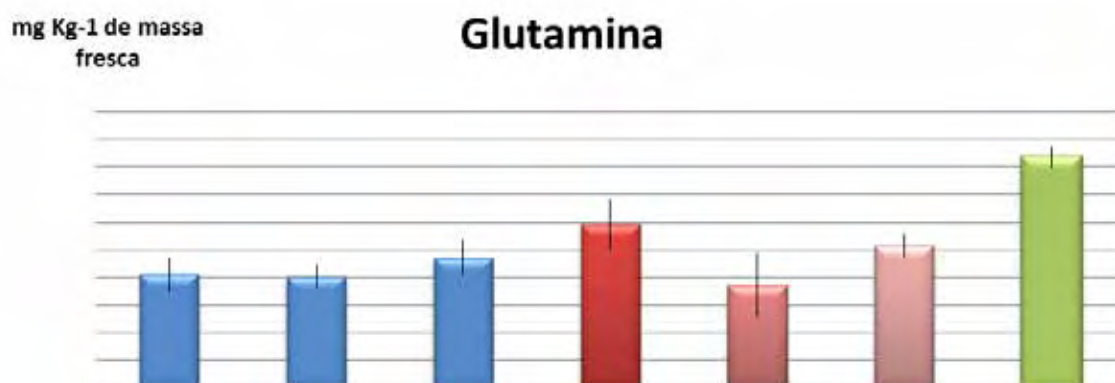


Figura 22. Concentração de glutamina (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes doses e formulações. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

Na Figura 23, estão apresentados os resultados das concentrações de serina nas plantas de soja. Para as duas formulações em todas as doses testadas foram observados aumentos significativos nos teores de serina nas plantas de soja.

Para a formulação a base de amônia o maiores incremento no teor de serina ocorreu para a dose de $1,25 \text{ L ha}^{-1}$ e para a formulação de potássio, apesar não serem observadas diferenças significativas estatisticamente foram observados maiores níveis para as

menores doses. Tal fato indica que subdoses de glufosinate são mais eficientes em aumentar os teores de serina nas plantas de soja.



Figura 23. Concentração de serina (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes doses e formulações. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

Na Figura 24, os aumentos foram significativos para todas as doses em relação à testemunha para ambos os produtos. Exceto para a formulação de potássio na dose intermediária não são observadas diferenças significativas entre as formulações e doses. A variação entre as formulações de potássio e de amônia foram pouco significantes para se afirmar que o efeito das doses foi positivo ao acúmulo de ácido aminolevulênico na planta.

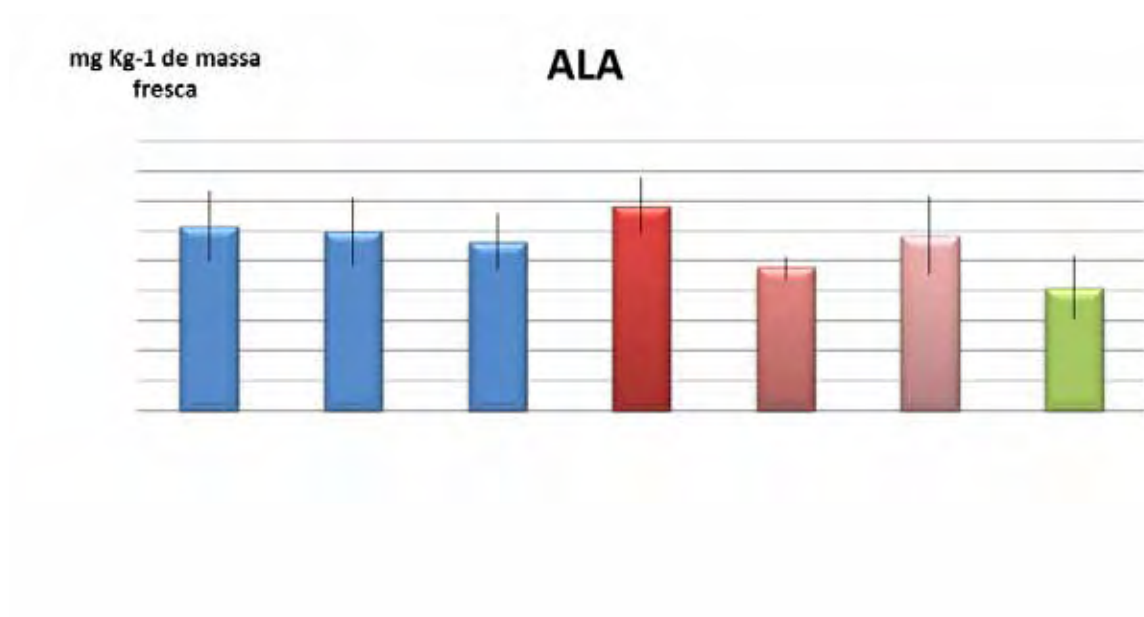


Figura 24. Concentração de ácido aminolevulênico (ALA) (mg kg⁻¹) na massa fresca de plantas de soja em diferentes doses e formulações. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

Observa-se na Figura 25, que para a formulação de glufosinate de amônia as doses diferiram significativamente, quando avaliado os níveis de glufosinate internamente às folhas, já para a formulação com potássio apesar de se observar uma redução nos níveis do composto, as diferenças não foram significativas.

Quanto aos níveis de glufosinate nas plantas para ambas as formulações, são observadas maiores quantidades para a formulação de potássio quando comparados à formulação de amônia para todas as três doses. As diferentes formulações, apesar de conter o mesmo ingrediente ativo, podem ter apresentado diferenças quanto à absorção e translocação. Diferenças na tolerância ao glufosinate de amônio entre as espécies foram explicadas em termos de taxa e extensão de absorção e/ou a translocação do herbicida (ACASTER; WEITZMAN, 1985; KÖCHER; LÖTZSCH, 1985) e/ou na capacidade das espécies para desintoxicar ou inativar o herbicida (ACASTER; WEITZMAN, 1985; HAAS; MTLLE, 1987).

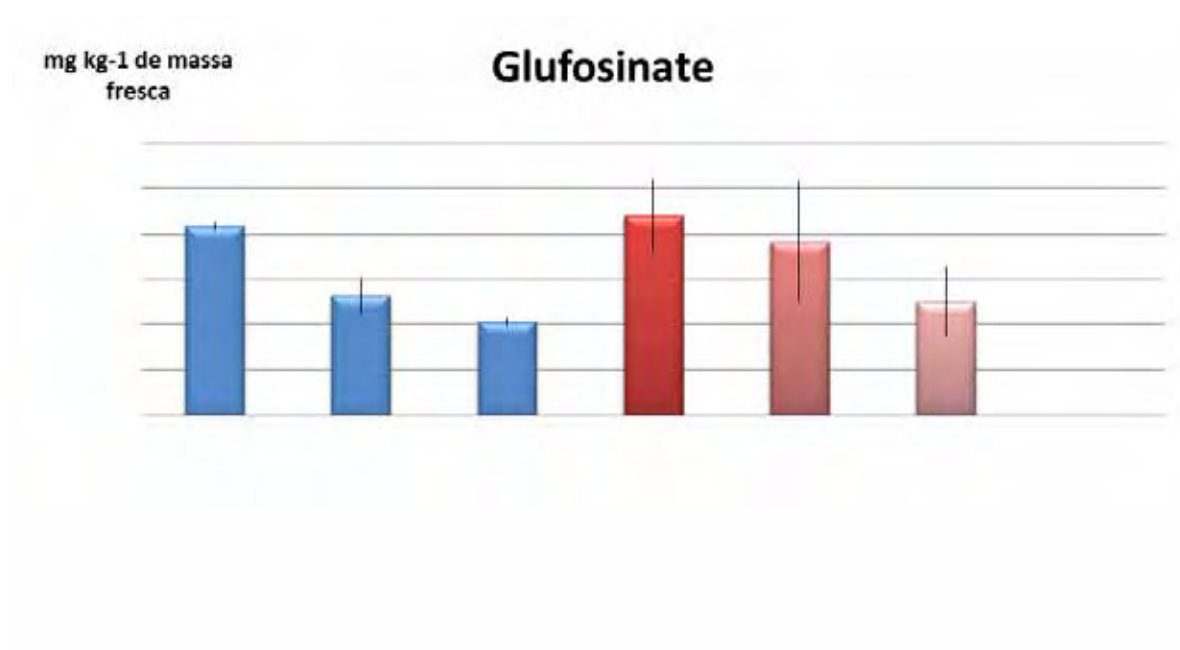


Figura 25. Concentração de glufosinate (mg kg^{-1}) na massa fresca de plantas de soja em diferentes doses e formulações. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

6.6 ETR e Fitointoxicação

Na Figura 26, estão apresentados os dados de fitointoxicação para o experimento com diferentes períodos de avaliação. Não são observadas diferenças significativas entre as formulações, no entanto, observa-se aos 6 DAA uma tendência de maior fitointoxicação para a formulação de potássio. A maior intoxicação das plantas observada está de acordo com os resultados do acúmulo de amônia e de alguns dos compostos discutidos anteriormente, o que demonstra que a formulação de potássio foi mais efetiva em causar danos na soja. Para a cultura, tal fato não é desejável, porém para o controle de plantas daninhas esta formulação poderia gerar ganhos em eficácia de controle.

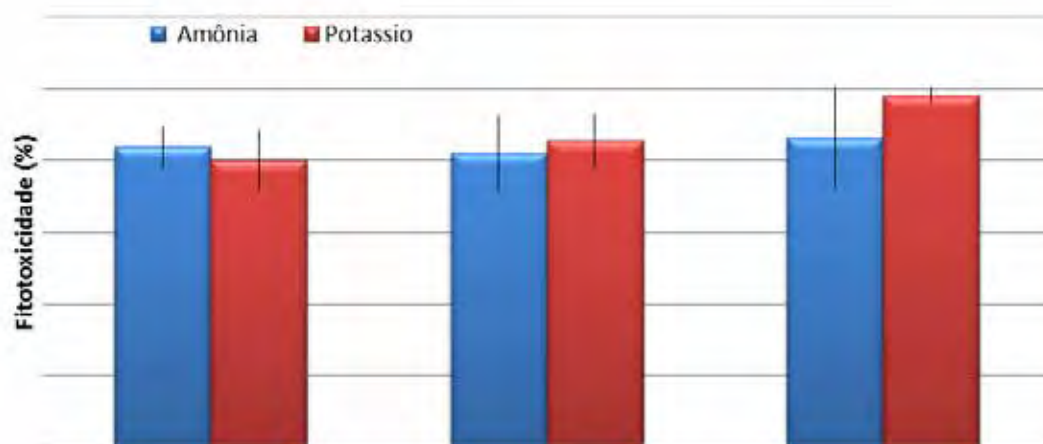


Figura 26. Intoxicação das plantas de soja em diferentes períodos e formulações de glufosinate. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.



Figura 27. Plantas sem a aplicação do glufosinate (testemunha) aos 2 DAA.



Figura 28. Plantas tratadas com glufosinate de potássio ($2,5 \text{ L ha}^{-1}$) aos 2DAA



Figura 29. Plantas tratadas com glufosinate de amônia ($2,5 \text{ L ha}^{-1}$) aos 2DAA.



Figura 30. Plantas tratadas com a formulação de potássio à esquerda e de amônia à direita aos 4DAA.



Figura 31. Plantas tratadas com a formulação de potássio à esquerda e de amônia à direita aos 6DAA.

De acordo com a Figura 32, ao analisarmos a intoxicação das plantas para o experimento com diferentes doses, observa-se para a formulação de potássio que a dose $2,5 \text{ L ha}^{-1}$ foi significativamente superior às menores doses da mesma formulação. Para a formulação de amônia as duas maiores doses apresentaram resultados similares e superiores aos da menor dose. Novamente são observados maiores níveis de intoxicação para a formulação de potássio comparado à formulação de amônia na dose de $0,625$ e $2,5 \text{ L ha}^{-1}$.

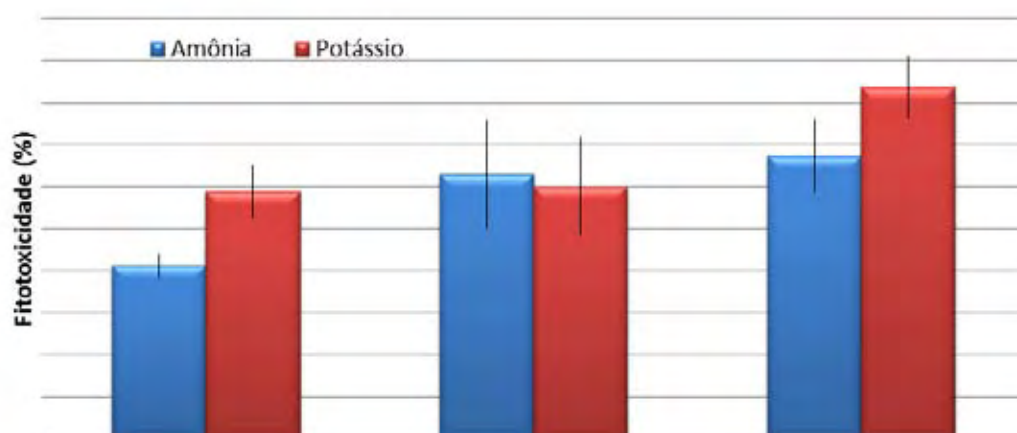


Figura 32. Intoxicação das plantas de soja em diferentes doses e formulações. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.



Figura 33. Detalhe das plantas tratadas com a formulação de amônia na dose 2,5 L ha⁻¹ à direita e potássio na dose 2,5 L ha⁻¹ à esquerda



Figura 34. Detalhe das plantas tratadas com a formulação de amônia na dose $1,25 \text{ L ha}^{-1}$ à direita e potássio na dose $1,25 \text{ L ha}^{-1}$ à esquerda



Figura 35. Detalhe das plantas tratadas com a formulação de amônia na dose $0,625 \text{ L ha}^{-1}$ à direita e potássio na dose $0,625 \text{ L ha}^{-1}$ à esquerda

Nas Figuras 36 e 37 estão apresentados os resultados da porcentagem da ETR das plantas de soja tratadas em relação à testemunha para os dois experimentos (períodos e doses). Na Figura 36, aos 2DAA não são observadas diferenças significativas na ETR para as aplicações das duas formulações. A partir dos 4DAA as plantas tratadas com a formulação a base de potássio, apresentaram menores porcentagens de ETR do que as plantas tratadas com a formulação de amônia. Aos 6DAA não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

Alguns autores apontaram que o mecanismo de inibição da enzima GS (glutathione sintetase) causa efeitos secundários no fluxo de elétrons do Fotossistema II, ocorrendo danos irreversíveis a planta (SAUER et al. 1987; WILD et al. 1987). Os autores descreveram uma diminuição na fluorescência máxima momentânea, bem como uma diminuição na extinção de fluorescência sob condições fotorrespiratórias após um tratamento com glufosinate. A extinção de fluorescência foi demonstrada como sendo proporcional ao rendimento quântico do fotossistema II (GENTY et al. 1989). Assim, os parceiros da reação de fotorrespiração importantes são removidos, a fotorrespiração é bloqueada, e a reação de luz da fotossíntese é deprimida (SAUER et al. 1987; WILD et al. 1987; LACUESTA et al. 1992). Coetzer e Al-Khatib (2001) descreveram uma rápida inibição da taxa fotossintética e um aumento na condutância estomática 2 horas após a aplicação glufosinate. Seis horas após a aplicação do glufosinate a taxa fotossintética em *Amaranthus palmeri* foi reduzida em 63%.

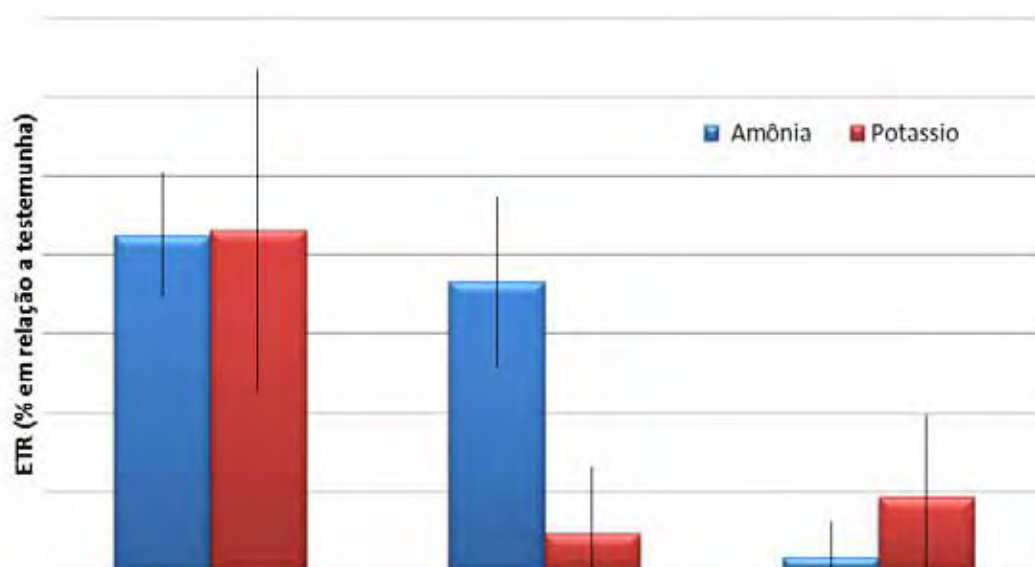


Figura 36. Porcentagem de ETR em relação à testemunha em soja em diferentes períodos e formulações. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

A dose de 2,5 L ha⁻¹ para formulação glufosinate de potássio apresentou diferença significativa, mostrando uma rápida queda da ETR em relação às demais doses e formulações (Figura 37). Alguns autores colocam que quedas na radiação fotossinteticamente ativa também podem reduzir a eficácia do glufosinate (KÖCHER, 1983).

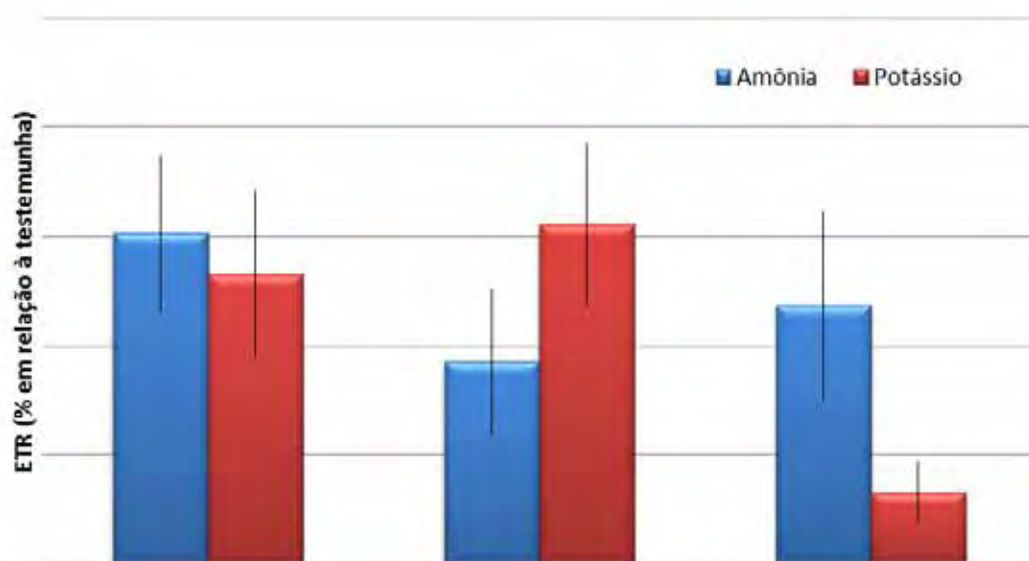


Figura 37. Porcentagem de ETR em relação à testemunha em soja em diferentes doses e formulações. Botucatu/SP, 2012. A barra de erros corresponde ao intervalo de confiança a 10%.

7 CONCLUSÕES

Foram observados incrementos nos níveis de glutamato, serina e ácido aminolevulênico e redução nos níveis de glutamina nas plantas tratadas com glufosinate.

Foram observadas nas plantas concentrações de glufosinate proporcionais às doses do herbicida aplicados em ambas as formulações.

Quando comparados à testemunha, todos os tratamentos diferiram significativamente pelos intervalos de confiança. Assim, pode-se observar que o acúmulo de amônia nas plantas de soja é um indicador bastante importante da intoxicação das mesmas pelo glufosinate e que a formulação com sal de potássio apresentou maiores níveis de intoxicação.

8 REFERÊNCIAS

- ACASTER, M. A.; WEITZMAN, P. D. J. Kinetic analysis of glutamine synthetases from various plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 189, p. 241, 1985.
- ALMEIDA, F. S. **Controle de plantas daninhas em plantio direto**. Londrina: IAPAR, 1991. v. 67, 34 p.
- ANDERSON, D. M. et al. The influence of soil moisture, simulated rainfall and time of application on the efficacy of glufosinate-ammonium. **Weed Research**, Oxford, v. 33, p. 149-160, 1993.
- ANDERSON, D. M. et al. The influence of temperature and relative humidity on the efficacy of glufosinate-ammonium. **Weed Research**, Oxford, v. 33, p. 139-147, 1993.
- AUTIO, S. et al. Adsorption of sugar beet herbicides to Finnish soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 55, p. 215-226, 2004.
- BAILEY, G. W.; WHITE, J. L. Factors influencing adsorption, desorption and movement of pesticides in soils. **Residue Review**, New York, v. 32, p. 29-32, 1970.
- BEHRENDT, H.; MATTHIES, M. Leaching and transformation of glufosinate ammonium and its main metabolite in a layered soil column. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 9, p. 541-549, 1990.
- BELLINDER, R. R.; HATZIOS, K. K.; WILSON, H. P. Mode of action investigations with the herbicides HOE-39866 and SC-0224, **Weed Science**, Lawrence, v. 33, p. 779, 1985.

BROMILOW, R. H.; CHAMBERLAIN, K.; EVANS, A. A. Phloem translocation of strong acids-glyphosate, substituted phosphonic acids and sulfonic acids in *Ricinus communis*. **Pesticide Science**, Oxford, v. 37, p. 33-37, 1993.

BRUCE, J.; KELLS, J. Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with preplant and preemergence herbicides. **Weed Technology**, Lawrence, v. 4, n. 3, p. 642- 647, 1990.

COETZER, E.; AL-KHATIB, K. Photosynthetic inhibition and ammonium accumulation in Palmer amaranth after glufosinate application. **Weed Science**, Lawrence, v. 49, p. 454-459, 2001.

CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA, R. S. **Dessecação antecedendo a semeadura direta pode afetar a produtividade**. Piracicaba: Potafós, 2005. p. 14-15. (Informações Econômicas, 109).

DALL'AGNOLL, A.; HIRAKURI, M. H. **Realidade e perspectivas do Brasil na produção de alimentos e agroenergia, com ênfase na soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 59 p.

DEVINE, M. D.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. Inhibition of amino acid biosynthesis. In *Physiology of Herbicide Action*. **Englewood Cliffs**, New Jersey, p. 252-263, 1993.

DEVOS, Y. et al. Environmental impact of herbicide regimes used with genetically modified herbicide-resistant maize. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 17, p. 1059-1077, 2008.

DONN, G. Der Einfluss von Klimafaktoren auf die herbizide Wirkung von ammonium-(3-amino-3-carboxy-propyl)-methylphosphinat (Glufosinate). Medel. Fac. Landbouwwetenschap. **Rijksuniv Gent**, Nussallee, v. 47, p. 105–110, 1982.

FABER, M. J. et al. Persistence and leachability of glufosinate-ammonium in a Northern Ontario terrestrial environment. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 45, p. 3672-3676, 1997.

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

FENTEM, P. A.; LEA, P. J.; STEWART, G. R. Ammonia assimilation in the roots of nitrate- and ammonia-grown *Hordeum vulgare* (cv Golden Promise). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 71, p. 496-501, 1983.

FERREIRA C. et al. Avaliação da eficiência do herbicida finale (amônio glufosinato) aplicado na modalidade sequencial, no controle químico de buva, na operação de manejo em plantio direto, da cultura da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Londrina: SBPC, 2010. p. 1435-1439.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 990, p. 87-92, 1989.

GILES, C. H. et al. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanism and in measurement of specific surface areas of solids. **Journal of Chemical Society**, Washington, DC, v. 14, p. 3973-3993, 1960.

GOETZ, W. et al. A new non selective herbicide: Chemical and toxicological properties; mode of action and metabolism. In: ASIAN-PACIFIC WEED SCIENCE SOCIETY CONFERENCE, 9., 1983. Manila. **Proceedings...** Manila: Asian-Pacific Weed Science Society, 1983, p 401-404.

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 f. Tese (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

HAAS, P.; MULLER, F. Behaviour of glufosinateammonium in weeds. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE WEEDS, 1987, Bracknell. **Proceedings...** Bracknell: BCPC, 1987. p. 1075.

HARPER, J. E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K. J. et al. **Physiology and determination of crop yield.** Madison: ASA, p. 285-302. 1994.

HUPPE, H. C.; TURPIN, D. H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, p. 577-607, 1994.

ISMAIL, B. S.; AHMED, A. R. Attenuation of the herbicidal activities of glufosinate-ammonium and imazapyr in 2 soils. **Agriculture Ecosystems and Environmental**, Zurich, v. 47, n. 4, p. 279-285, 1994.

JEWELL, T.; BUFFIN, D. Health and environmental impacts of glufosinate ammonium. **Pesticides Action Network**, London, p. 1-22, 2001.

JOY, K. W. Ammonia, glutamine, and asparagine: a carbon-nitrogen interface. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, p. 2103, 1988.

KHAN, S. U. **Pesticides in the soil environment.** Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1980. 240 p.

KISHORE, G. M.; SHAH, D. M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annual Review Biochemical**, Palo Alto, v. 51, p. 627, 1988.

- KLECZKOWSKI, L. A. Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, p. 339-367, 1993.
- KLEM, K. et al. Comparison of chlorophyll fluorescence and whole-plant bioassays of isoproturon. **Weed Research**, Oxford, v. 42, p. 335-341, 2002.
- KÖCHER, H. Influence of the light factor on physiological effects of the herbicide HOE 39866, **Annals Applied Biology**, Oxford, v. 4, p. 227, 1983.
- KÖCHER, H.; LOTZSCH, K. Uptake, translocation and mode of action of the herbicide glufosinateammonium in warm climate weed species. In: ASIAN PACIFIC WEED SCIENCE CONFERENCE, 10., 1985, Chiang Mai. **Proceedings...** Chiang Mai: Asian-Pacific Weed Science Society, 1985, p. 193.
- KOGER, C. H. et al. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Mississippi. **Weed Technology**, Lawrence, v. 18, n. 3, p. 820-825, 2004.
- LACUESTA, M. et al. Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and chlorophyll fluorescence by barley leaves illuminated under photorespiratory and non-photorespiratory conditions. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 43, p. 159-165, 1992.
- LAM, H. M. et al. Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 887-898, 1995.
- LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Resistência ao glyfosate em biótipos de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 26, n. 2, p. 467-471, 2008.
- LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62 p.
- LANGELUDDEKE, P.; BAEDEL, H.; BIERINGER, H. Trials on the influence of air humidity and rainfall on the efficacy of glufosinate-ammonium. In: SYMPOSIUM FACTORS INFLUENCING HERBICIDAL ACTIVITY AND SELECTIVITY, 1988, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen, 1988. p. 227-232.
- LAZAROTO, C. A.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 852-860, 2008.
- LEA, P. J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P. J.; LEEGOOD, R. C. **Plant biochemistry and molecular biology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p. 155-180.
- LEA, P. J. et al. The action of 2-amino-4 (methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 23, p. 1-6, 1984.

LEASON, M. et al. Inhibition of pea leaf glutamin synthetase by sulphoximine, phosphinothricin and other glutamate analogues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 21, p. 855-857, 1982.

LEEMANS, J. et al. The use of glufosinate as a selective herbicide on genetically engineered resistant tobacco plants. **British Crop Protection Conference-Weeds**, Bracknell, p. 867, 1987.

MACHADO, A. T. et al. Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em diferentes genótipos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 4, n. 1, p. 45-47, 1992.

MAGALHÃES, J. R. et al. Nitrogen assimilation efficiency in maize genotypes under ammonia stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 163-166, 1993.

MANDERSCHIED, R.; WILD, A. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 135, 1986.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C. et al. Glutamine synthetase–glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink–source nitrogen cycle in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 444-456, 2006.

MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E. **Biochemistry**. Washington, DC: Benjamin Cummings Co., 1990. 1129 p.

MATHIASSEN, S. K.; KUDSK, P. The influence of adjuvants on the activity, rainfastness and response to climatic conditions of glufosinate. In: SYMPOSIUM QUANTITATIVE APPROACHES IN WEED AND HERBICIDE RESEARCH AND THEIR PRACTICAL APPLICATION, 1993, Braunschweig. **Proceedings...** Braunschweig: EWRS, 1993. p. 243-250.

MERSEY, B. G. et al. Factors affecting the herbicidal activity of glufosinate-ammonium: adsorption, translocation, and metabolism in barley and green foxtail. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 37, p. 90-98, 1990.

MOREIRA, M. S. et al. Herbicidas alternativos para o controle de biótipos de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* resistentes ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, p. 167-175, 2010.

MOREIRA, M. S. et al. Resistência de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 1, p. 157- 164, 2007.

NISHIMOTO, R. K.; RAHMAN, A. Effect of incorporation depth and soil organic matter content on herbicidal activity. **New Zealand Journal Agricultural Research**, Singapore, v. 28, p. 531-535, 1985.

PATEL, F. et al. Redução de rendimento de grãos de soja devido à variação em densidades e períodos de introdução da buva (*Conyza bonariensis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., Ribeirão Preto, 2010. **Resumos...** Ribeirão Preto: FUNEP, 2010. p. 1674-1677.

PETERSEN, J.; HURLE, K. Einsatz von Liberty zur Klettenlabkrautbekämpfung in glufosinat resistentem Winterraps. **Z PflKrankh PflSchutz**, Sonderh, v. 17, p. 389-396, 2000.

PITELLI, R. A. Interferência das plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, p. 16-27, 1985.

PLINE, W.; WU, J.; HATZIOS, K. K. Absorption, translocation, and metabolism of glufosinate in five weed species as influenced by ammonium sulfate and pelargonic acid. **Weed Science**, Lawrence, v. 47, p. 636-643, 1999.

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

RAHMAN, A.; DYSON, C. B.; BURNEY, B. Effect of soil organic matter on the phytotoxicity of soil-applied herbicides-field studies. **New Zealand Journal Agricultural Research**, Singapore, v. 6, p. 69-75, 1978.

RASCHE, E. et al. Development of glufosinate ammonium tolerant crops and the selective use of the herbicide glufosinate ammonium. In: MCLEAN, G. D.; EVANS, G. **Herbicide-resistant crops and pastures in Australian farming systems**. Parkes: Bureau of Resource Sciences, 1995. p. 25-33.

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.

RIDLEY, S. M.; MCNALLY, S. F. Effects of phosphinothricin on the isozymes of glutamine synthetase isolated from plant species which exhibit varying degrees of susceptibility to the herbicide, **Plant Science**, Shannon, v. 39, p. 31, 1985.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: Ed. dos Autores, 2005. 675 p.

ROMAN, E. S.; DIDONET, A. D. **Controle de plantas daninhas no sistema de plantio direto de trigo e de soja**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1990. 32 p.

ROSS, M. A.; LEMBI, C. A. **Applied weed science**. New York: Macmillan Publishing Company, 1985. 340 p.

SAUER, H.; WILD, A.; RUHLE, W. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. II. The causes of inhibition of photosynthesis. **Zeitschrift fuer Naturforschung**. Tuebingen, v. 42, p. 270-278, 1987.

SCHWERDTLE, F.; BIERINGER, H.; FINKE, M. Hoe 39866 $\pm$ ein neues nicht selektives Blattherbizid. Zeitschrift fuÈr P⁻anzenkrankheiten und P⁻anzenschutz. **Sonderheft**, Munich, v. 9, p. 431-440, 1981.

STECKEL, G. J. et al. Glufosinate efficacy on annual weeds as influenced by rate and growth stage. **Weed Technology**, Lawrence, v. 11, p. 484-488, 1997.

TOMLIN, C. **The pesticide manual**. 12th ed. Farnham: The British Crop Protection,, 2000. 555 p.

TRAINER, G. D. et al. Response of horseweed biotypes to foliar applications of cloransulamethyland glyphosate. **Weed Technology**, Lawrence, v. 19, n. 2, p. 231-236, 2005.

VANGESSEL, M. J. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. **Weed Science**, Lawrence , v. 49, n. 6, p. 703-705, 2001.

VANGESSEL, M. J. et al. Influence of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) growth stage on response to glyphosate applications. **Weed Technology**, Lawrence, v. 23, n. 1, p. 49-53, 2009.

VARGAS, L. et al. Buva (*Conyza bonariensis*) resistentes ao glyphosate na região sul do Brasil. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 3, p. 573-578, 2007.

VIDAL, R. A. et al. Impacto da temperatura, irradiância e profundidade das sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 2, p. 309-315, 2007.

WALLSGROVE, R. M. et al. Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism, **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 6, p. 301, 1983.

WATANABE, N. et al. Dual targeting of spinach Protoporphyrinogen Oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of in-frame initiation codons. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 23, p. 20447-20481. 2001.

WEBER, J. B.; PETER, C. J. Adsorption, bioactivity, and evaluation of soil tests for alachlor, acetochlor, and metolachlor. **Weed Science**, Lawrence, v. 30, p. 14-20, 1982.

WELCH, C.; ROSS, M. A. Effect of glyphosate, glufosinate, and 2,4-D on Canada thistle and hemp dogbane root systems. **Weed Science Society**, Lawrence, v. 52, p. 33-35, 1997.

WILD, A.; SAUER, H.; RUBLE, W. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. I. Inhibition of photosynthesis and accumulation of ammonia, **Zeitschrift fuer Naturforschung**. Tuebingen, v. 42, p. 263, 1987.

WOO, K. C.; OSMOND, B. Stimulation of ammonia and 2- oxoglutarate-dependent O₂ evolution in isolated chloroplasts by dicarboxylates and the role of the chloroplast in photorespiratory nitrogen recycling. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 69, p. 591-596, 1982.