

LARISSE DE FREITAS SILVA

**ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E METABÓLICAS CAUSADAS
PELO GLIFOSATO EM DUAS ESPÉCIES NEOTROPICAIS E NA ESPÉCIE
MODELO *Arabidopsis thaliana***

Larisse de Freitas Silva
Doctor Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586a
2016
Silva, Larisse de Freitas, 1987-
Alterações morfofisiológicas e metabólicas causadas pelo
glifosato em duas espécies neotropicais e na espécie modelo
Arabidopsis thaliana / Larisse de Freitas Silva. – Viçosa, MG,
2016.

viii, 77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luzimar Campos da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Herbicida. 2. Glifosato. 3. Glifosato - Efeitos
fisiológicos. 4. Metabolismo vegetal. 5. Fotossíntese.
6. Bioquímica vegetal - Pesticida. 7. *Arabidopsis thaliana*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Vegetal. Programa de Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22 ed. 632.954

LARISSE DE FREITAS SILVA

**ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E METABÓLICAS CAUSADAS
PELO GLIFOSATO EM DUAS ESPÉCIES NEOTROPICAIS E NA ESPÉCIE
MODELO *Arabidopsis thaliana***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

LARISSE DE FREITAS SILVA

**ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E METABÓLICAS CAUSADAS
PELO GLIFOSATO EM DUAS ESPÉCIES NEOTROPICAIS E NA ESPÉCIE
MODELO *Arabidopsis thaliana***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 09 de novembro de 2016.

Bárbara Baeso Moura

Cleberson Ribeiro

Kacilda Naomi Kuki

Juraci Alves de Oliveira

Luzimar Campos da Silva
(Orientadora)

Aos meus queridos pais, por acreditarem na minha educação e me apoiarem em todos os momentos de minha vida.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa, por me acolher durante mais uma etapa da minha vida profissional, ao Projeto Floresta Escola e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

A professora Luzimar Campos da Silva pelas preciosas dicas, pela atenção despendida a mim, por estar sempre presente, me acolher com muita prestatividade, pela amizade e as boas gargalhadas, muito obrigada.

Ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós Graduação em Botânica. Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Nutrição Mineral de Plantas e a Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) obrigada por abrirem as portas para mim, por serem tão agradáveis, prestativos, acolhedores e dedicados.

Aos técnicos Aurora, Patrícia, Antônio Cordeiro e Rogério Gomide por me ajudarem na rotina do laboratório e estarem sempre disponíveis: muito obrigada.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, especialmente ao Gilmar e a Karla, pelo aporte na realização da microscopia eletrônica de varredura.

A Estación Experimental del Zaidín/CSIC Espanha, especialmente ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e ao professor Francisco Javier Corpas, por acolher me durante meu estágio sanduíche, muito importante para a minha formação profissional e por contribuir para a realização desta tese.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente aos meus coorientadores; professores Adriano Nunes Nesi e Alan Carlos Costa e ao Cleberson Ribeiro, colaborador deste projeto.

Muito obrigada!

ÍNDICE

Resumo.....	v
Abstract.....	vii
1. Introdução Geral.....	1
2. Objetivo Geral.....	7
2.1. Objetivos Específicos.....	7
3. Referências Bibliográficas.....	8
4. Conclusões Gerais.....	77

CAPÍTULO 1

Alterações morfofisiológicas e metabólicas causadas pelo glifosato em *Handroanthus chrysotrichus* e *Garcinia gardneriana*

1. Resumo.....	13
2. Introdução	13
3. Material e métodos.....	16
4. Resultados	22
5. Discussão.....	26
6. Conclusão.....	32
7. Referências Bibliográficas.....	32

CAPÍTULO 2

Mecanismos de defesa contra o estresse nitro-oxidativo induzido por glifosato em *Arabidopsis thaliana*

1. Resumo.....	53
2. Introdução.....	53
3. Material e métodos.....	55
4. Resultados.....	59
5. Discussão.....	61
6. Conclusão.....	64
7. Referências Bibliográficas.....	65

RESUMO

SILVA, Larisse de Freitas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2016. **Alterações morfofisiológicas e metabólicas causadas pelo glifosato em duas espécies neotropicais e na espécie modelo *Arabidopsis thaliana***. Orientadora: Luzimar Campos da Silva. Coorientador: Adriano Nunes Nesi.

Glifosato (N-(fosfonometil) glicina) é um herbicidas mais utilizados no mundo. Poucos estudos elucidam quais são os efeitos que ele pode provocar em espécies não agricultáveis e na espécie modelo *Arabidopsis thaliana*. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivos: avaliar os efeitos que o glifosato provoca nas espécies arbóreas *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae) e *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi (Clusiaceae) tendo em vista as alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas em resposta ao estresse provocado por ele e quais ajustes metabólicos que ocorrem no sistema antioxidante de *A. thaliana* quando exposta ao mesmo herbicida. Para tal, indivíduos de *H. chrysotrichus* e *G. gardneriana* com oito meses de idade foram submetidos a aplicação na parte aérea, do herbicida RoundUp® ultra, contendo 65% (m/m) de glifosato [N- (fosfonometil) glicina] como ingrediente ativo concentrações de 0, 360, 720, 1080 e 1440 g. ia ha⁻¹. 72 HAA (horas após a aplicação), foram avaliados os parâmetros bioquímicos e aos 7 DAA (dias após a aplicação) foram obtidos fragmentos foliares para análises anatômicas em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. O glifosato provocou alterações no metabolismo do carbono, fotossíntese e fluorescência em *H. chrysotrichus*. Foram observadas alterações no sistema antioxidativo enzimático e houve incremento da peroxidação lipídica em ambas espécies. Ocorreram alterações anatômicas a nível ultraestrutural, estrutural e visual, esta última apenas em *H. chrysotrichus*. *H. chrysotrichus* mostrou-se ser a espécie mais sensível ao herbicida por apresentar danos mais pronunciados, tendo, portanto, potencial biosindicador/biosensor de áreas impactadas pelo herbicida glifosato. Plantas de *A. thaliana* foram germinadas em placa de petri contendo meio de cultivo e 20 µM de glifosato, após 14 dias, houve coleta das plantas e realização das análises bioquímicas. Houve detecção histoquímica de O₂⁻ e de peroxidação lipídica nas plantas tratadas e aumento de oxidação de proteínas, indicando que a produção de ROS colocou a planta sob estresse. Ocorreu aumento da atividade das principais enzimas do sistema antioxidativo e do ciclo ascorbato-glutationa nas plantas tratadas, acompanhado da diminuição do teor de H₂O₂. Glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) foram as desidrogenases com maior atividade nas plantas tratadas. Além disso, 6PGDH se

mostrou a enzima mais estável quando tratamos *A. thaliana* com diferentes poderes redutores e oxidantes, sugerindo que esta enzima pode ser crucial para o fornecimento de poder redutor nesta espécie quando tratada com o herbicida glifosato. *A. thaliana* apesar de apresentar sintomas de estresse como redução de crescimento e murcha da parte aérea quando tratada com Glyphose é capaz de reajustar seu sistema antioxidante de forma a minimizar os danos causados por este estresse, o que garante a sua sobrevivência neste tempo de exposição e doses utilizadas.

ABSTRACT

SILVA, Larisse de Freitas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2016. **Morphological and metabolic alterations caused by glyphosate in two neotropical species and in model species *Arabidopsis thaliana*.** Adviser: Luzimar Campos da Silva. Co-adviser: Adriano Nunes Nesi.

Glifosato (N- (phosphonomethyl) glycine) is the most used herbicide in the world. Few studies have display what effects it can cause in not cultivable species and in the model species *Arabidopsis thaliana*. Thus, this study aims to Thus, this study aims to evaluate the effects that glifosato causes the species *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae) e *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi (Clusiaceae) in view of the changes biochemical, physiological and anatomical response to stress caused by it and what metabolic adjustments that occur in the antioxidant system of *A. thaliana* when exposed to same herbicide. Individuals of *H. chrysotrichus* and *G. gardneriana* eight months age were subjected to application in the shoot, the herbicide RoundUp® ultra containing 65% (m / m) of glifosato [N- (phosphonomethyl) glycine] as an active ingredient concentrations of 0 , 360, 720, 1080 and 1440 g. ai ha⁻¹. 72 HAA (hours after application) were evaluated biochemical parameters and 7 DAA (days after application) were obtained leaf fragments to anatomical analyzes in light microscopy and scanning electron microscopy. Glifosato caused changes in carbon metabolism, photosynthesis and fluorescence in *H. chrysotrichus*. Changes were observed in antioxidant enzyme system and there was an increase in lipid peroxidation in both species. There were anatomical alterations in the ultrastructural, structural and visual levels, the latter one only in *H. chrysotrichus*. *H. chrysotrichus* proved to be the most sensitive species to the herbicide to present more pronounced damage and therefore potential biosindicador / biosensor areas impacted by the glifosato herbicide. *A. thaliana* plants were germinated in petri dishes containing culture medium 20 µM glifosato and after 14 days, was collected from plants and conducting biochemical analyzes. There histochemical detection O₂.- and lipid peroxidation in the treated plants and increased oxidation of proteins, indicating that ROS production plant placed under stress. There was increased activity of key enzymes of the antioxidant system ascorbate and glutathione cycle in treated plants, together with the reduction of H₂O₂ content. Glucose-6 phosphate dehydrogenase (G6PDH) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) were desidrogenases with greater activity in the treated plants. Furthermore, 6PGDH proved the most stable enzyme when dealing with different *A. thaliana*

reducing and oxidizing power, suggesting that this enzyme may be critical to provide reducing power in this species when treated with glifosato. *A. thaliana* despite symptoms of stress as shoot growth and wilting reduction when treated with Glyphose is able to adjust its antioxidant system in order to minimize the damage caused by this stress, which ensures its survival in this time exposure and doses used.

1. Introdução Geral

Breve histórico e mecanismo de ação do herbicida glifosato

O Brasil é um país agrário e conta com produção em larga escala de diversos produtos em todo o seu território. A agricultura está instalada nos mais diferentes biomas e, portanto, eles encontram-se sujeitos aos impactos que esta prática oferece.

O glifosato (N-(fosfonometil) glicina) foi sintetizado por Henri Martin, um farmacêutico suíço e foi somente testado como herbicida em 1970 por John E. Franz na multinacional Monsanto Co. (Franz et al., 1997; Gomes et al., 2014). Desde a sua introdução comercial em 1974, o glifosato se destaca por ser um dos herbicidas mais usados no mundo, em virtude do seu baixo custo e seu mecanismo de ação (Basantani et al., 2011; Orcaray, 2012). Seu uso é registrado para mais de uma centena de culturas como arroz, algodão, milho, soja e pastagens (Toni et al., 2006).

O glifosato é um herbicida pós-emergente, não seletivo e de ação sistêmica, que pertence ao grupo químico das glicinas substituídas. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da atividade da enzima cloroplastídica 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS EC 2.5.1.19), atuante na rota do chiquimato, por atuar como análogo do segundo substrato desta enzima, o fosfoenolpiruvato (PEP) (Orcaray, 2012). Por esta razão, elevados níveis de chiquimato são um indicativo da presença de glifosato nos tecidos vegetais (Michitte et al., 2007; Ding et al., 2011).

A enzima EPSPS catalisa a condensação do chiquimato-3 fosfato (S3P) e do PEP, sua inativação impede a biossíntese do corismato e, conseqüentemente, dos aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina, indispensáveis à síntese de proteínas e divisão celular, além de participarem na formação de metabólitos secundários como alcaloides, ubiquinona, antocianinas, vitamina K, lignina, promotores e inibidores de crescimento e fitoalexinas (Rabello et al., 2012).

Absorção e translocação do herbicida

A absorção do glifosato é um processo que envolve uma rápida penetração inicial através da cutícula, seguida por uma absorção lenta. A difusão é considerada o principal processo de transporte do herbicida pela cutícula (Caseley e Coupland, 1985). A absorção normalmente aumenta com a redução do volume de aplicação e aumento de sua concentração (Stahlman e Phillips, 1979; Townson e Butler, 1990). Uma vez aplicado, o glifosato penetra pela superfície foliar, transloca-se via apoplasto até o floema e então, a órgãos e regiões com alta atividade metabólica e índice de

crescimento como os meristemas apicais (Machado et al., 2008). Entretanto, também se observou o transporte do herbicida através do xilema, embora em menor intensidade, considerando-se que há maior concentração do herbicida em órgãos drenos quando comparado com as folhas (Preston & Wakelin, 2008).

A absorção do glifosato é altamente polar e apresenta baixa lipofilicidade. Devido a estas características, é possível que a sua passagem da superfície da folha para o apoplasto ocorra através de um caminho hidrofílico através da cutícula lipofílica (Caseley e Coupland, 1985). Os principais componentes químicos das ceras epicuticulares são os n-alcenos, ésteres, álcoois e ácidos graxos (Baker, 1982). A cutícula é primariamente apolar, mas existem diferenças no seu grau de hidrofobicidade devido a sua composição. Essas diferenças podem refletir na absorção do glifosato, resultando numa menor absorção do produto quando a cutícula é mais hidrofóbica (Chachalis et al., 2001).

A ação deste herbicida ocorre através de duas fases: (i) movimento para o local de ação e, (ii) consequências metabólicas resultantes de sua interação com o local de ação. A primeira fase inicia-se com a aplicação, seja de forma direta sobre a folhagem ou via solo para atingir as raízes. Em seguida, ocorre a absorção para então atingir o local de ação. Essas etapas incluem a entrada nas células, difusão por curtas distâncias, transporte por longas distâncias, conversão metabólica do herbicida e entrada nas organelas celulares. A interação do herbicida com o local de ação pode ser considerada como a primeira etapa da segunda fase, que pode resultar na morte da planta (Gravena et al., 2009).

Sintomas de fitotoxicidade causados pela aplicação do herbicida

Sintomas comuns de fitotoxicidade em espécies vegetais causadas por glifosato são o aparecimento de cloroses, necroses, malformação nas folhas e murchas, diminuição da taxa de germinação e de crescimento das mudas (Brecke e Duke, 1980; Tuffi- Santos et al., 2006; Santos et al., 2007; Basantani, et al., 2011). Os estudos em anatomia vegetal são de fundamental importância para elucidar características da planta que podem contribuir para a resistência, tolerância ou sensibilidade aos herbicidas (Lorentz et al., 2011; Costa et al., 2012). A espessura do limbo e da área foliar são parâmetros estudados e que podem elucidar estas questões (Lima JR. et al., 2006; Gondim et al., 2008).

Desordens nutricionais são reportadas frequentemente em espécies submetidas a tratamentos com glifosato sejam estas resistentes ou não (Bott et al., 2008). O herbicida

é um quelador de cátions divalentes especialmente Fe e Mn (Bernardes et al., 2005), o que pode reduzir a eficiência do vegetal em processos fisiológicos onde estes elementos são requeridos, além de promover desordens nutricionais por mobilizar estes nutrientes nos tecidos onde o produto foi aplicado (Cakmak et al., 2009). Por outro lado, a presença destes cátions na superfície onde o herbicida será aplicado é conhecida por reduzir a sua atividade e por limitar a sua absorção (Bernards et al., 2005).

Alterações metabólicas

O glifosato é capaz de provocar alterações no metabolismo do carbono e do nitrogênio (Cakmak et al., 2009). Cerca de 20% do carbono fixado pelas plantas é direcionado para a rota do ácido chiquímico. É possível que a inibição da EPSPS desregule o fluxo de carbono por mecanismos alternativos de *feedback* ou ainda que o aumento de açúcares livres, processo comumente relatado em condições de estresse vegetal, seja em virtude de alterações na fotossíntese ou na translocação de fotoassimilados (Cakmak et al., 2009; Orcaray et al., 2012).

O glifosato promove diminuição no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, nas taxas fotossintéticas e respiratórias (Ding et al., 2011). Pode interferir na biossíntese de compostos secundários, reduzindo o nível de todos os compostos fenólicos Deng (2005). Pode afetar a fotossíntese pela diminuição da condutância estomática (Fuchs et al., 2002), através de alterações bioquímicas (Flexas et al., 2008), pela perda de carotenoides a qual favorece a biodegradação dos demais pigmentos (Mateos-Naranjo e Perez-Martin, 2013) ou ainda, pela imobilização e absorção de nutrientes essenciais provocada pela presença do herbicida (Zobiolo et al., 2011).

Produção de espécies reativas de oxigênio e efeitos no sistema antioxidativo

Ainda não é claro quais os efeitos que este herbicida provoca no metabolismo primário e antioxidativo vegetal e quais os ajustes metabólicos realizados para que a homeostase celular seja retomada, o que torna nosso estudo de grande relevância. Vários estresses abióticos levam a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) como $\bullet\text{OH}$ (radical hidroxila), O_2^- (ânion superóxido) H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e $^1\text{O}_2$ oxigênio singleto (Gil e Tuteja, 2010), as quais são geradas principalmente pelo excesso de elétrons livres. A aplicação do glifosato é capaz de alterar as fases fotoquímicas da fotossíntese, provocando o excesso de elétrons livres no cloroplasto (Mateos-Naranjo e Perez-Martin, 2013), causando por este motivo um aumento na produção de ROS, as quais em excesso podem reagir com ácidos graxos

polinsaturados, danificando membrana plasmática, proteínas, ácidos nucleicos e consequente afetando a homeostase celular (Gil e Tuteja, 2010).

Para a proteção contra esses intermediários de oxigênio prejudiciais ao metabolismo e danoso à estrutura celular, as plantas investem energia para aumentar a produção de agentes antioxidantes. Enzimas como a Dismutase Superóxido (SOD), catalase (CAT); peroxidase (POX); peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutatona (GPX) e a redutase da glutatona (GR), atuam convertendo as ROS em intermediários menos tóxicos (Apel e Hirt, 2004; Gill et al., 2013). De forma geral, a SOD é a primeira enzima atuante, convertendo o O_2^- a H_2O_2 . CAT, POX, APX e GPX convertem o H_2O_2 a H_2O , terminando o ciclo de desintoxicação. A APX utiliza o ascorbato e glutatona (GSH) como substrato doador de elétrons e por esse motivo, para a regeneração da glutatona e continuação do ciclo, tem-se o NADP(H) como fonte doadora de elétrons e a atuação da Redutase da glutatona (Gill et al., 2013).

Diversos autores constataram aumento da atividade da APX em plantas submetidas à aplicação de glifosato, indicando sua participação no processo de detoxificação do herbicida (Cataneo et al., 2003). Outros compostos celulares auxiliam no controle do estresse provocado por altas concentrações de ROS, como a glutatona, ácido ascórbico, tocoferol, fenóis e carotenoides (El Sayed et al., 2014). A função desses componentes é variada e complexa e muitas vezes atuam também no sistema antioxidativo enzimático, como ocorre com o ascorbato e a glutatona (Gill e Tuteja, 2010; El- Sayed et al., 2014). De forma geral, esses antioxidantes não enzimáticos agem como doadores de elétrons para reações enzimáticas, estabilizam a membrana plasmática quando danificadas pela peroxidação lipídica ou atuam como dissipadores de energia em excesso nos fotossistemas (Mittler, 2002)

Espécies reativas de nitrogênio

Estresse nitrosativo (RNS) define uma situação em que o vegetal tem produção desregulada de NO e seus derivados, a qual pode ter uma consequência danosa à célula. O principal marcador de estresse nitrosativo é a nitração dos resíduos de tirosina de proteínas (Corpas et al., 2007). A nitração ocorre quando há a adição de um radical Nitro ($-NO_2$) ao anel de tirosina e esta modificação pode alterar os mecanismos regulatórios antes exercidos por aquela proteína (Radi, 2004; Galetskiy et al., 2011).

Todo este processo de nitração proteica é desencadeado pela presença de radicais como óxido nítrico (NO), ânion superóxido (O_2^-) peróxido de hidrogênio (H_2O_2), nitrito (NO_2^-), todos capazes de gerar agentes nitradores: peróxido nitrito

(ONOO⁻) e dióxido de nitrogênio (NO₂) (Ischiropoulos, 2003; Souza et al., 2008), indicando que algumas reações para a produção de RNS são dependentes das ROS (Rümer et al., 2009). As RNS podem inativar os diferentes complexos da cadeia respiratória (Brown, 1999); alteram a conformação de proteínas e dos lipídeos (Prescott, 1999) e inibem a síntese de proteína e/ou DNA (Bundy et al., 2000).

Produção de poder redutor celular

O NADPH é um cofator chave para a homeostase do poder redutor celular por ser um indispensável doador de elétrons para inúmeras funções celulares, requerido para diversas vias metabólicas, biossíntese de açúcar no ciclo de Calvin (Barroso et al., 1998), para a atividade do citocromo P 450 redutase (Ro et al., 2002). NADPH é também requerido em processos de detoxificação celular, sendo necessário no metabolismo de ROS e RNS, reduzindo, por exemplo, a glutatona Oxidada (GSSG) a glutatona Reduzida (GSH), componentes do ciclo ascorbato-glutatona (Hodges et al., 2003; Airaki et al., 2012). NADPH é ainda requerido para a geração de radical superóxido pela NADPH oxidase (NOX) e como cofator para a geração de óxido nítrico, molécula central no metabolismo de RNS (Corpas et al., 2009). Por isso, índices adequados de NADPH é essencial para todos os organismos vivos.

A manutenção entre as formas reduzidas e oxidadas de NADP é mantida principalmente pela ferridoxina NADP oxidase (Leterrier et al., 2012; Corpas e Barroso, 2014). Entretanto, durante a fase bioquímica da fotossíntese, um grupo de NADP desidrogenases localizadas em diferentes compartimentos celulares são as principais enzimas capazes de gerar poder redutor na forma de NADPH (Corpas e Barroso, 2014), são elas: Glicose 6- fosfato desidrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49), 6- fosfogluconato desidrogenase (6PGDH, EC 1.1.1.44), ambas pertencentes a via das pentoses fosfatadas, NADP enzima málica (NADP-ME, EC 1.1.1.40) e NADP isocitrato desidrogenase (NADP-ICDH, EC 1.1.1.42). Considerando que estresse oxidativo e nitrosativo pode aumentar a demanda de poder redutor celular, é possível que a reciclagem do NADPH, através de uma maior atividade das NADP desidrogenase, seja um importante mecanismo de tolerância desenvolvido por espécies vegetais expostas a estresse.

Problemática da aplicação do herbicida

Durante a aplicação do glifosato, pode ocorrer o efeito de deriva, ocasionando efeitos negativos sobre as plantas não alvo como a vegetação ao entorno da lavoura (Koger et al., 2005; Santos et al., 2007; Londo et al., 2011; Tuffi-Santos et al., 2011;

Boutin et al., 2014). A deriva é resultado de diversos fatores como as doses aplicadas, as condições climáticas no momento da aplicação e o tamanho das gotas pulverizadas.

Embora a agricultura em grandes áreas seja uma prática difundida em nosso país, pouco são os estudos que elucidam os efeitos que o glifosato promove em espécies nativas não agricultáveis, no que diz respeito à seletividade, os efeitos fitotóxicos e quais implicações que a utilização desse herbicida pode promover em comunidades vegetais ao longo de anos de exposição. Procurar estas respostas é um pré-requisito para o desenvolvimento de métodos eficientes de biomonitoramento quanto ao uso do produto e para o estabelecimento de dosagens seguras que permitam o uso correto do glifosato e também a manutenção da flora localizada ao entorno das grandes monoculturas e, por consequência, o equilíbrio de todo o ecossistema.

Garcinia gardneriana (Planch. & Triana) Zappi (Clusiaceae) (Bacupari) e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae) (Ipê Amarelo) são espécies amplamente distribuídas por todo o território nacional e possuem grande interesse econômico e ecológico. Muitas vezes encontram-se na interface entre áreas agricultáveis e remanescentes de vegetação nativa o que as colocam em contato com um grande número de herbicidas e outros defensivos que são utilizados nas monoculturas, inclusive o glifosato.

Pouco se sabe sobre os efeitos do glifosato sobre estas espécies e/ou as possíveis alternativas que estas plantas desenvolvem e que as fazem capazes de resistir aos danos causados por ele. Ou ainda, quais os efeitos que o herbicida provoca nas células e que colocam a planta sob estresse. Caso as alternativas desenvolvidas pelas plantas não sejam suficientes para suportar os efeitos deletérios, existe o risco de morte do indivíduo o que em longo prazo, pode extinguir a população de uma dada área, afetando todo aquele ecossistema.

Arabidopsis thaliana é uma Brassicacea mundialmente utilizada para os mais diferentes trabalhos científicos. Estudos como esse, o qual avalia as alterações ocorrentes no metabolismo antioxidativo e na geração de poder redutor de uma espécie modelo quando exposta ao herbicida glifosato é elucidativo. Este estudo poderá contribuir para o entendimento do comportamento de *A. thaliana* frente a este estresse facilitando estudos futuros mais acurados e podendo ser referência para outras espécies, especialmente as não agricultáveis, onde as informações são mais escassas.

2. Objetivo geral

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, o primeiro deles teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação do herbicida glifosato nas espécies *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae) e *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi (Clusiaceae), tendo em vista as alterações fisiológicas, bioquímicas, anatômicas e visuais em resposta ao estresse provocado por ele.

Visando trabalhos futuros sobre a mesma temática, isto é: quais as implicações que este herbicida provoca em espécies não agricultáveis, entretanto com uma abordagem molecular, principalmente das enzimas antioxidantes e de outros metabólitos envolvidos em resposta a estresse, idealizamos o segundo artigo, o qual objetiva-se esclarecer quais ajustes que são realizados no metabolismo antioxidativo e na geração de poder redutor de *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia (Brassicaceae), espécie modelo, quando exposta ao herbicida glifosato.

2.1. Objetivos específicos

Primeiro artigo capítulo

- Determinar a concentração de ácido chiquímico nas folhas das duas espécies nativas;
- Caracterizar, visualmente e morfológicamente, as folhas das plantas nativas tratadas com glifosato, revelando se há aparecimento de sintomas e como se dá a progressão destes danos;
- Analisar quais os efeitos provocados pelo herbicida na anatomia e micromorfologia caracterizando os danos ocorridos, revelando se há a possibilidade do estabelecimento de marcadores anatômicos para as duas espécies quando expostas a este herbicida;
- Avaliar a influência de diferentes concentrações de glifosato sobre a composição mineral das espécies;
- Investigar os efeitos do glifosato sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e das trocas gasosas.
- Analisar os efeitos do herbicida sobre a peroxidação lipídica nas folhas de ambas espécies;
- Determinar a influência do herbicida no sistema antioxidativo enzimático;
- Avaliar a influência do herbicida no metabolismo do carbono das duas espécies.

Segundo capítulo

- Avaliar a influência do glifosato no crescimento e na obtenção de biomassa de *A. thaliana*;
- Determinar o estresse celular induzido pelo glifosato em *A. thaliana*, através da quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e oxidação de proteínas.
- Histolocalizar *in situ* a produção de peróxido de oxigênio e ânion superóxido;
- Avaliar a atividade de enzimas do sistema antioxidativo, do ciclo ascorbato-glutationa e das principais enzimas geradoras de poder redutor celular.
- Identificar a influencia de diferentes agentes redutores e oxidantes sobre a ação das principais enzimas geradoras de poder celular;
- Identificar se há diferença na atividade de isoformas das principais enzimas do sistema antioxidativo, através de PAGE não desnaturante.

3. Referências Bibliográficas

Airaki M; Leterrier M; Meteos RM; Valderrama R; Chaki M; Barroso JB; Del-Río LA; Palma JM; Corpas FJ (2012) Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress Plant, Cell and Environment 35: 281–295

Apel k, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 55:373–99

Baker, EA (1982) Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: Cutler, D. F.: Alvin, KL, Price CE (Ed). The plant cuticle. London: Academic Press. P. 140- 161

Barroso JB, Peragón, J; Contreras-Jurado C (1998a) Impact of starvation-refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems. American Journal of Physiology 274:1578–1587

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287

Basantani M, Srivastava A, Sen S (2011) Elevated antioxidant response and induction of tau-class glutathione S-transferase after Glyphosate treatment in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Pesticide Biochemistry and Physiology 99:111–117

Bernards ML, Thelen KD, Muthukumaran RB, Penner D, McCracken JL (2005) Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on Glyphosate absorption and translocation. Weed Sci 53:787–794

- Bott S, Tesfamariam T, Candan H, Cakmak I, Römheld V, Neumann G (2008) Glyphosate -induced impairment of plant growth and micronutrient status in Glyphosate -resistant soybean (*Glycine max* L.). *Plant Soil* 312:185–194
- Boutin C, Strandberg B, Carpenter D, Mathiassen SK, Thomas PJ (2014) Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications? *Environmental Pollution* 185:295-306
- Brecke BJ, Duke WB (1980) Effect of Glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. *Plant Physiol* 66:656–659
- Brown GC (1999) Nitric Oxide and mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411:351-369
- Bundy RE, Marczin N; Chester AH; Yacoub M (2000) A redox based mechanism of nitric oxide-induced inhibition of DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells *British Journal of Pharmacology* 129:1513-1521
- Cakmak I, Yazici A, Tutus Y, Ozturk L (2009) Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non- Glyphosate resistant soybean. *Europ J Agronomy* 31:114–11
- Caseley JC, Coupland D (1985) Environmental and plant factors affecting Glyphosate uptake movement and acidity. In: Grossbard, E; Atkinson, DA (Ed.). *The herbicide Glyphosate*. London: Butterworths. P. 92-123
- Cataneo AC, Destro GFG, Ferreira LC, Chmha HL, Sousa DCF (2003) Atividade da glutatona S-transferase na degradação do herbicida glifosato em plantas de milho (*Zea mays*). *Planta Daninha* 21(2):307-312
- Chachalis D, Reddy KN, Elmore CD (2001) Characterization of leaf surface, wax composition and control of redvine and trumpet creeper with Glyphosate. *Weed Science Campaign* 49:156-163
- Corpas FJ e Barroso JB (2014) NADPH generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro oxidative stress induced by adverse environmental conditions. *Frontiers in environmental science* 2:1-5
- Corpas FJ; Carreras A, Valderrama R; Chaki M; Palma JM; del Río LA; Barroso JB (2007) Reactive Nitrogen species and nitrosative stress in plants. *Plant Stress* 1:37-41
- Corpas FJ; Hayashi M; Mano S; Nishimura M; Barroso JB (2009) Peroxisomes Are Required for in Vivo Nitric Oxide Accumulation in the Cytosol following Salinity Stress of Arabidopsis Plants. *Plant Physiol* 151:2083-2084
- Costa NV, Martins D, Rodella RA, Rodrigues-Costa ACP (2012) Alterações Anatômicas foliares em plantas de *Brachiaria subquadriflora* submetidas à aplicação de herbicidas. *Planta Daninha* 30:253-261

- Deng F (2005) Effects of Glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium L.*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 82:16-26
- Ding W, Reddy KN, Zablotowicz RM, Bellaloui N, Bruns HA (2011) Physiological responses of Glyphosate -resistant and Glyphosate sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of Glyphosate. *Chemosphere* 83:593-598
- El- Sayed OM, El- Gammal OHM, Salama ASM (2014) Effect of ascorbic acid, proline and jasmonic acid foliar spraying on fruit set and yield of Manzanillo olive trees under salt stress. *Scientia Horticulturae* 23:32–37
- Flexas J, Ribas-Carbo M, Diaz-Espejo A, Galmes J, Medrano H (2008) Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ* 31:602–621
- Franz J, Mao M, Sikorski J (1997) Glyphosate: a unique and global herbicide. American Chemical Society Monograph 189: Washington DC.
- Fuchs MA, Geiger DR, Reynolds, TL, Bourque JE (2002) Mechanisms of Glyphosate toxicity in velvet leaf (*Abutilon theophrasti medikus*). *Pestic Biochem Phys* 74:27–39
- Galetskiy, D., Lohscheider, J. N., Kononikhin, A. S., Popov, I. A., Nikolaev, E. N., and Adamska, I. (2011) Phosphorylation and nitration levels of photosynthetic proteins are conversely regulated by light stress. *Plant Mol. Biol* 77: 461–473
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12):909-930
- Gill SS, Anjun NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N (2013) Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70- 204:212
- Gomes MP, Smedbol E, Chalifour A, Hénault-Ethier, Labrecque M, Lepage L, Lucotte M, Juneau P (2014) Alteration of plant physiology by Glyphosate and its by- product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany* 60:1-13
- Gondim ARO, Puiatti M, Ventrella MC, Cecon PR (2008) Plasticidade anatômica da folha de taro cultivado sob diferentes condições de sombreamento. *Bragantia* 67:1037-104
- Gravena R, Filho RV, Alves PLCA, Mazzafera P, Gravena AR (2009) Low Glyphosate rates do not affect *Citrus limonia* (L.) *Osbeck seedlings*. *Pest Manag Sci* 65:420-425
- Hodges M, Flesch V, Gálvez S, Bismuth E (2003) Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. *Plant Physiol Biochem* 41:577–585
- Ischiropoulos, H. (2003). Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 305: 776–783

Koger CH, Shaner DL, Krutz LJ, Walker TW, Buehring N, Henry WB, Thomas WE, Wilcut JW (2005) Rice (*Oryza sativa*) response to drift rates of Glyphosate. *Pest Manag Sci* 61:1161–1167

Leterrier M, Barroso JB, Valderrama R, Palma JM, Corpas FJ (2012) NADP Dependent Isocitrate Dehydrogenase from *Arabidopsis* Roots Contributes in the Mechanism of Defence against the Nitro-Oxidative Stress Induced by Salinity. *The Scientific World Journal* 265: 1-9

Lima-Jr EC, Alvarenga AA, Castro EM, Vieira CV, Barbosa JPRAD (2006) Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* submetidas a diferentes níveis de sombreamento. *Revista Árvore* 30:33-41

Londo JP, Bollman MA, Sagers CL, Lee EH, Watrud LS (2011) Glyphosate -drift but not herbivory alters the rate of transgene flow from single and stacked trait transgenic canola (*Brassica napus*) to non-transgenic *B. napus* and *B. rapa*. *New Phytologist* 191:840-849

Lorentz L, Beffa R, Kraehmer H (2011) Recovery of plants and histological observations on advanced weed stages after Glyphosate treatment. *Weed Research* 51:333–343

Machado AFL, Meira RMS, Ferreira LR, Ferreira FA, Tuffi-Santos LD, Fialho CMT, Machado MS (2008) Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*. *Planta Daninha* 26:1-8

Mateos-Naranjo E, Perez-Martin A (2013) Effects of sub-lethal Glyphosate concentrations on growth and photosynthetic performance of non-target species *Bolboschoenus maritimus*. *Chemosphere* 93:2631–2638

Michitte P, Prado R, Espinoza N, Ruiz-Santaella JP (2007) Mechanisms of Resistance to Glyphosate in a Ryegrass (*Lolium Multiflorum*) Biotype from Chile Gauvrit Source. *Weed Science* 55(5):435-440

Mittler, R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410

Orcaray L, Zulet A, Zabalza A, Royuela M (2012) Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide Glyphosate. *Journal of Plant Physiology* 169:27–33

Prescott SM (1999) A thematic series on oxidation of lipids as a source of messengers. *Journal of Biological Chemistry* 274: 22901

Preston C, Wakelin A (2008) Resistance to Glyphosate from altered herbicide translocation patterns. *Pest Management Science* 64:372-376

Rabello WS, Monnerat PH, Campanharo M, Espindula MC, Ribeiro G (2012) Growth and phosphorus absorption by common bean 'Xodó' genotype under effect of Glyphosate reduced rates. *Revista Brasileira de Herbicidas* 11(2):204-212

Radi, R (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 4003–4008

Santos BM, Gilreath JP, Esmel CE, Siham MN (2007) Effects of sublethal Glyphosate rates on fresh market tomato. *Crop Protection* 26:89–91

Souza, JM., Peluffo, G., and Radi, R. (2008) Protein tyrosine nitration –functional alteration or just a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* 45: 357–366

Stahlman PW, Phillips WM (1979) Effects os water quality and spray volume on Glyphosate phytotoxicity. *Weed Science Chichester* 27(1):38-41

Toni LRM, Santana H, Zaia DAM (2006) Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Química Nova* 29:829-833

Townson JK, Butler R (1990) Uptake, translocation and phytotoxicity of imazapyr and Glyphosate in *Imperata cylindrical*: effect of herbicide concentration, position of deposit and two methods of direct contact application. *Weed Research, Oxford*, v. 30, p. 235- 243

Tuffi-Santos LD, Wagner Junior A, Silva JOC, Pimentel LD, Santos CEM, Bruckner CH, Ferreira FA (2006) Deriva de herbicidas e efeito de fungicida x herbicida em plantas jovens de pessegueiro. *Planta Daninha* 24:505-512

Tuffi-Santos LD, Graça RN, Alfenas AC, Ferreira FA, Melo CAD, Machado MS (2011) Glyphosate reduces urediniospore development and *Puccinia psidii* disease severity on *Eucalyptus grandis*. *Pest Management Science* 67:876-880

Zobiolo LHS, Kremer RJ, Oliveira-Jr RS, Constantin J (2011) Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” Glyphosate ato resistant soybean (*Glycine max* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99: 53–60

Capítulo I

Alterações morfofisiológicas e metabólicas causadas pelo glifosato em *Handroanthus chrysotrichus* e *Garcinia gardneriana*

Resumo

Glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo, em virtude do seu mecanismo de ação, sendo efetivo ao controle de várias espécies daninhas, além de apresentar baixo custo. Nós objetivamos avaliar os impactos do glifosato em duas espécies não agricultáveis: *Handroanthus chrysotrichus* e *Garcinia gardneriana*, procurando estabelecer biomarcadores e biosensores indicativos da presença desse herbicida. Plantas de oito meses de idade foram submetidas a aplicação aérea do herbicida nas concentrações de 0, 360, 720, 1080 e 1440 g. ia ha⁻¹. Houve acúmulo de ácido chiquímico nas folhas das duas espécies. Alterações visuais foram encontradas apenas em *H. chrysotrichus*, enquanto que alterações anatômicas e ultraestruturais foram observadas em ambas espécies. A taxa de peroxidação lipídica foi maior em *H. chrysotrichus*, ao passo que maior atividade enzimática foi encontrada em *G. gardneriana*. Glifosato afetou fotossíntese e fluorescência da clorofila *a* em *H. chrysotrichus*. *H. chrysotrichus* foi considerada a espécie mais sensível deste trabalho por apresentar alterações mais pronunciadas sendo, portanto, uma espécie com potencial bioindicador e biosensor para áreas impactadas com o herbicida glifosato.

Palavras chave: fotossíntese, metabolismo do carbono, estresse oxidativo, anatomia vegetal.

Introdução

Herbicidas e fertilizantes são os compostos químicos mais utilizados na agricultura convencional com o objetivo de aumentar a produção (Boutin, 2013). Dentre esses compostos, o glifosato se destaca por ser o herbicida mais utilizado no mundo (Dai et al., 2016). Glifosato é um herbicida pós-emergente, não seletivo e de ação sistêmica. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da atividade da enzima cloroplastídica 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS EC 2.5.1.19), atuante na rota do chiquimato, por atuar como análogo do segundo substrato desta enzima, o fosfoenolpiruvato (PEP) (Orcaray, 2012). A enzima EPSPS catalisa a condensação do chiquimato-3 fosfato (S3P) e do PEP, formando 5-enolpyruvylshikimato-3-fosfato impedindo a biossíntese do corismato e conseqüentemente dos aminoácidos aromáticos,

o que causa injúrias em espécies vegetais e muitas vezes leva a planta à morte (Yanniccari et al., 2012).

De forma indireta, o glifosato pode afetar os parâmetros fotossintéticos, por interferir na produção de clorofila, carotenoides, ácidos graxos e aminoácidos (Fedtke e Duke, 2005). Estudos apontam diminuição na condutância estomática e na assimilação de CO₂ (Olesen e Cedergreen, 2010). O glifosato pode também prejudicar o metabolismo do carbono por interferir no metabolismo e translocação de açúcar (Orcaray et al., 2012).

Estresses abióticos levam a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gil e Tuteja, 2010), as quais são geradas principalmente pelo excesso de elétrons livres. ROS em excesso podem reagir com ácidos graxos polinsaturados, danificando a membrana plasmática e outros componentes celulares e, conseqüentemente, afeta a homeostase celular (Gil e Tuteja, 2010). Existem diferentes fontes de produção de ROS, mas cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos são sítios potenciais dessa produção em virtude da constante presença de elétrons livres (Mittler, 2002). O estresse oxidativo gerado pelas ROS pode ser limitado por um sistema antioxidante: uma complexa conexão de enzimas codificadas por inúmeros genes (Miller et al., 2010). Este sistema inclui moléculas como ácido ascórbico, carotenoides e glutathione (Gill e Tuteja, 2010; El- Sayed et al., 2014) e enzimas como catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e peroxidases, as quais atuam convertendo as ROS em intermediários menos tóxicos (Gill et al., 2013).

Embora esteja bem estabelecido primeiro local de ação do glifosato, ainda não são claros quais são os efeitos que este herbicida provoca no metabolismo primário e antioxidativo vegetal e quais ajustes metabólicos são realizados para que a homeostase celular seja retomada. Análises dos processos e metabólitos de plantas submetidas ao herbicida permitem identificar mecanismos envolvidos na defesa das plantas a este estresse e a inter-relacionar as diferentes rotas metabólicas, gerando informações mais interligadas e elucidativas (Cataneo et al., 2003; Orcaray et al., 2012).

As alterações bioquímicas e fisiológicas geradas podem progredir para alterações anatômicas e morfológicas. Anatomicamente, o glifosato é capaz de promover diminuição da lâmina foliar, descamação da cera epicuticular e alterações no formato dos tricomas (Santos et al., 2015). Sintomas comuns de fitotoxicidade são o aparecimento de cloroses, necroses, malformação das folhas e murchas, diminuição da taxa de germinação e de crescimento das mudas (Brecke e Duke, 1980; Tuffi- Santos et al., 2006; Santos et al., 2007; Basantani, et al., 2011). A anatomia vegetal é uma técnica

efetiva e agrega valor as análises visuais, porque além de fornecer informações prognósticas acerca dos efeitos do contaminante, revela também a extensão real do dano provocado pelo contato com o agente estressor (Araújo et al., 2014; Freitas-Silva et al., 2016).

Quando ocorre a aplicação do herbicida em espécies agricultáveis, doses subletais podem alcançar espécies não-alvo (Gomes et al., 2014), impactando-as, seja por induzir o aparecimento de injúrias em suas partes vegetativas ou diminuindo a produção de sementes (Boutin, 2014). Espécies sensíveis podem apresentar sintomas, visuais ou não, sendo estas espécies uma alternativa para monitorar a presença do contaminante no ambiente (De Temmerman et al., 2004). A seleção de plantas bioindicadoras e/ou biosensoras de ambientes impactados com Glyphosate é fundamental para garantir políticas de monitoramento e preservação de espécies nativas não agricultáveis que se encontram ao entorno de áreas de produção agrícola.

Garcinia gardneriana (Mart. ex DC.) Standl (*Clusiaceae*) (Bacupari) e *Handroanthus chrysotrichus* (Planch. & Triana) Zappi (*Bignoniaceae*) (Ipê Amarelo) são duas espécies arbóreas, amplamente distribuídas no território nacional. *Garcinia gardneriana* possui propriedades medicinais em virtude da grande concentração de antioxidantes existentes em seus frutos, enquanto *Handroanthus chrysotrichus* é uma das espécies mais conhecidas e cultivadas no Brasil, sendo usada para paisagismo de parques e jardins, além da sua madeira possuir grande valor de venda. Pouco se sabe sobre os efeitos do glifosato sobre estas espécies e as possíveis alternativas que estas plantas possuem e que as fazem capazes de suportar aos danos causados por ele.

Tendo em vista o amplo uso do herbicida glifosato em áreas agricultáveis que se encontram a cerca de remanescentes de vegetação nativa e a importância econômica e ecológica de ambas espécies, nós desejamos testar as seguintes hipóteses: (i) doses usuais do herbicida glifosato serão capazes de provocar alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas em espécies não agricultáveis? (ii) *Garcinia gardneriana* e *Handroanthus chrysotrichus* desenvolverão biomarcadores morfológicos, anatômicos, micromorfológicos e bioquímicos quando submetidas ao estresse causado pelo glifosato os quais permitirão a inserção destas duas espécies em programas de biomonitoramento de ambientes impactados pelo herbicida?

Assim, este estudo objetivou avaliar as modulações que ocorrem nas folhas de *Handroanthus chrysotrichus* e *Garcinia gardneriana*, quando expostas de forma simulada, ao herbicida glifosato, considerando o sistema antioxidativo enzimático, peroxidação lipídica, fotossíntese, fluorescência e rotas metabólicas relacionadas à

incorporação de carbono. Procura-se esclarecer se o herbicida será capaz de provocar alterações nestes parâmetros e se elas serão capazes de atenuar os danos ocorridos a nível bioquímico, fisiológico, morfológico e visual.

Material e métodos

Condições de cultivo e aplicação dos tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa, localizada a 649 m de altitude, 20°45'20''S e 42°52'40'' O. Indivíduos das espécies *Handroanthus chrysotricus* (Mart. ex DC.) Standl (Bignoniaceae) e *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi (Clusiaceae) com aproximadamente oito meses de idade foram obtidos em viveiro e transplantadas para vasos plásticos de 3,8 litros contendo substrato para cultivo de mudas (TrostratoHT®). As mudas, uma planta por vaso, foram irrigadas a cada cinco dias com solução nutritiva de Hoagland a meia força iônica, pH 5,5 (Hoagland e Arnon, 1950) e com água a cada dois dias. As plantas permaneceram por um período de 30 dias nestas condições para aclimação. Posteriormente, indivíduos sadios foram padronizados visualmente de acordo com a altura e número de folhas para a aplicação dos tratamentos.

Após a aclimação, as plantas foram submetidas a aplicação na parte aérea, entre o período de 6h e 7h, do herbicida RoundUp® ultra (Monsanto Company, USA) contendo 65% (m/m) de glifosato [N-(fosfonometil) glicina] como ingrediente ativo nas concentrações de 0, 360, 720, 1080 e 1440 g. ia ha⁻¹. Para aplicação foi utilizado pulverizador costal de precisão propelado a CO₂, equipado com barra acoplada a quatro pontas de pulverização espaçadas 0,5 m entre si e válvula reguladora de pressão constante a 150 KPa, com vazão de 150 L ha⁻¹ de calda. As coletas para as análises bioquímicas ocorreram 72 horas após a aplicação (HAA) e as coletas para as análises anatômicas ocorreram 7 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA).

Quantificação de ácido chiquímico

Para a quantificação de ácido chiquímico, 0,03 g da matéria fresca das folhas localizadas no segundo nó de ambas espécies foram maceradas em HCl, centrifugadas a 15000 g a 4 °C, durante 25 minutos. A uma alíquota de 30 µL do sobrenadante foi acrescentado ácido periódico a 1%, incubado em banho úmido a 37 °C por 45 minutos. Ao extrato, foi acrescentado 500 µL de hidróxido de sódio 1 N e 300 µL de glicina

0,1M e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 380 nm e o coeficiente de extinção molar de $4,76 \times 10^4$ (Singh e Shaner, 1998).

Caracterização visual

Observações e registros com máquina fotográfica digital da parte aérea das plantas foram feitas no primeiro, quarto e sétimos dias após a aplicação do herbicida com o intuito de determinar quanto tempo após a aplicação dos tratamentos se dá o aparecimento dos sintomas.

Quantificação de nutrientes na matéria seca das plantas

Para determinar o teor de nutrientes na matéria seca, as folhas de ambas espécies foram colocadas em estufa de ventilação forçada a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ até atingirem peso constante. Amostras secas foram moídas em moinho (modelo TE048, Tecnal Marconi, Piracicaba, São Paulo) e peneiradas a dimensões menores que 1 mm. Os nutrientes N, P, K e S, foram determinados segundo a metodologia descrita por Malavolta et al., (1989), na qual os extratos foram obtidos por digestão nitroperclórica.

Avaliação das Trocas Gasosas

As taxas de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e a concentração de CO_2 no mesofilo (C_i) e a razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) foram obtidas por meio de sistema de medição de trocas gasosas LI-6400 (LI-COR Biosciences Inc. Nebraska, USA) equipado com uma fonte de luz azul/vermelho.

Para a avaliação, foram selecionadas folhas totalmente expandidas, sem sintomas. As folhas selecionadas para a avaliação das trocas gasosas foram também utilizadas para determinação das variáveis da fluorescência da clorofila a . As avaliações foram realizadas entre 8 h e 12 h da manhã utilizando um pulso de luz de $1000\text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$.

Fluorescência da clorofila a

Foram realizadas medições das variáveis de fluorescência da clorofila a com o auxílio do IRGA (LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA) com fluorômetro acoplado. Foi aferida a fluorescência inicial (F_0) e a fluorescência máxima (F_m). A partir desses valores, foi calculado a eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m , onde $F_v = F_m - F_0$).

Após a aplicação de uma iluminação actínica de 0,8 segundos e um pulso de luz actínica saturante foi avaliada a fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F_0) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'). A partir desses resultados foi possível calcular a fluorescência mínima da folha na região iluminada, segundo a fórmula: $F_0' = F_0 / [((F_m - F_0 / F_m) + (F_0 / F_m'))]$ (Oxborough e Baker, 1997). O rendimento quântico efetivo do PSII na folha iluminada foi determinado segundo Genty et al. (1989) usando a fórmula: $\phi_{II} = \Delta F / F_m' = (F_m' - F) / F_m'$.

O coeficiente de extinção fotoquímico foi calculado pela fórmula $q_L = (F_m' - F) / (F_m' - F_0)(F_0' / F)$ (Kramer et al., 2004). A taxa aparente de transporte de elétrons foi calculada segundo Bilger et al (1995), $ETR = \phi_{II} \cdot PAR \cdot 0,84 \cdot 0,5$, onde $\phi_{II} = (F_m' - F) / F_m'$; PAR é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; 0,5 é o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII; 0,84 corresponde a fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas. O *quenching* não fotoquímico foi calculado segundo a fórmula, $NPQ = F_m - F_m' / F_m'$ (Bilger e Björkman, 1990).

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é definido pelo conteúdo de Malondialdeído (MDA). A extração de MDA foi realizada segundo protocolo descrito por Hodges et al., (1999). Aproximadamente 0,015 g de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 1,7 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Os extratos obtidos foram centrifugados durante 15 minutos a 10.000 xg a 4 °C. 0,5 mL de extrato foram pipetados em microtubos: um para reação e outro representando o branco da reação.

Aos microtubos de reação, foram adicionados 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (TBA) em TCA 20%. Aos tubos do branco foram adicionados 1,5 mL de TCA 20%. Os tubos permaneceram em banho úmido a 95 °C durante meia hora e as reações foram paralisadas imediatamente em banho de gelo. Após resfriamento, o conteúdo de malondialdeído foi determinado através da leitura das absorvâncias das reações a 532 nm e a absorvância inespecífica foi determinada a 600 e 400 nm e subtraída das amostras. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Atividade das enzimas do sistema antioxidativo

Foram determinadas as atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11), redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7).

Para a obtenção do extrato enzimático foi utilizado 0,3 g de material vegetal obtido de folhas totalmente expandidas localizadas no terceiro nó, macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em meio de extração. Os meios de extração utilizados foram: 1) tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto et al., 1999), para as enzimas SOD, CAT e POX; 2) tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 1 mM, PMSF 1 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM e PVPP 1 % (p/v) (Peixoto et al., 1999), para a APX; e 3) tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, triton 0,02 % (v/v), DTT 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1 % (p/v) (Carlberg & Mannervik, 1985), para a GR.

A atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) foi determinada pela adição do extrato enzimático bruto ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar & Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorbância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance & Maehley, 1955).

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada adicionando ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7; H₂O₂ 40 μM, água destilada, 50 μl do extrato bruto. A atividade enzimática foi determinada pelo consumo de H₂O₂, pela queda na absorbância a 240 nm. O fator de extinção molar do H₂O₂ 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado para o cálculo da atividade (Havir e McHale, 1987, modificado).

Para a determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), foi utilizado meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 mM; metionina 13 mM, pH 7,8, e de riboflavina 2 μM, juntamente com 25 μl do extrato enzimático (Giannopolitis & Ries, 1977). A produção fotoquímica de azul de formazana foi determinada a 560 nm. Considerou-se uma unidade de SOD a quantidade da enzima capaz de inibir a redução do NBT em 50%.

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com Nakano & Asada (1981), utilizando-se meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0 e ácido ascórbico 0,8 mM, H₂O₂ 1,0 mM, água

destilada e 20 µl do extrato enzimático. A atividade enzimática foi determinada pela queda na absorvância a 290 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar do ascorbato 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ para o cálculo da atividade da enzima.

A atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.6.4.2) foi determinada em meio de reação, contendo tampão fosfato de potássio 1 M, EDTA 10 mM, MgCl₂ 0,1 mM, GSSG 50 mM, NADPH 10 mM e 20 µl do extrato bruto (Schaedle & Bassham, 1997). Observou-se a queda na absorvância a 340 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ para o cálculo da atividade.

A quantificação de proteínas foi feita segundo a metodologia de Bradford (Bradford, 1976), utilizando BSA como padrão. A absorvância foi lida no comprimento de onda de 595 nm.

Metabólitos primários

Para a determinação dos metabólitos primários, 15 mg de folhas sadias localizadas no terceiro nó de ambas espécies foram coletadas ao meio dia e pulverizadas em nitrogênio líquido. Os metabólitos foram extraídos em mix etanólico composto de etanol 98%, 80% e 50%, conforme descrito por Gibon et al., 2004; Nunes-Nesi et al., 2005 e Nunes-Nesi et al., 2007. A fração solúvel foi utilizada para a quantificação de pigmentos, açúcares, malato, fumarato e aminoácidos. A fração insolúvel foi utilizada para quantificação de proteínas e amido.

O teor de pigmentos nos tecidos foliares foi determinado segundo o protocolo descrito por Porra et al. (1989), utilizando 25 µl do extrato etanólico, 25 µl de etanol 80% e 120 µl de etanol 98%. A absorvância foi lida em 665 nm e 645 nm, para determinar as concentrações de clorofila *a* e *b*, respectivamente.

O teor de proteínas foi determinado, segundo o protocolo descrito por Gibon et al., (2004). Para isso, adicionou-se 400 µL de NaOH 0,1 M a cada reação. Após incubação de uma hora a 95 °C, o conteúdo de proteína foi estimado em 3 µl de amostra utilizando reagente de Bradford e BSA como padrão. A absorvância foi lida a 595 nm.

A determinação do teor de amido foi realizada utilizando 25 µl de amostras e 160 µl de um mix contendo tampão HEPES 0,1 M, MgCl₂ 30 mM pH 7, ATP 3 mM, NADP 1,4 mM e 56 U de glicose-6-fosfato desidrogenase. A absorvância foi determinada pontualmente a 340 nm Gibon et al., (2004).

Teores de glicose, frutose e sacarose foram determinados na fração solúvel adicionando 25 µl do extrato etanólico e 25 µl do etanol 80% a 160 µl de um mix

composto de tampão HEPES 0,1M; pH 7.0; contendo MgCl₂ 30 mM; ATP 3mM; NADP 1,4 mM e 56 U de glicose 6 fosfato desidrogenase (Fernie et al., 2001). A leitura da absorvância foi feita cineticamente a 340 nm. Para calcular a concentração de cada açúcar, uma vez estabilizada a densidade óptica (OD), foi acrescentada a cada reação 10 µl de hexoquinase, 10 µl de isomerase e 10 µl de invertase.

Malato e Fumarato foram determinados adicionando em cada reação 20 µl de tampão Tricina 0,2 M, pH 9.0, 10 µl de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio 10 Mm), 5 µl de NAD⁺, 2 µl de fenazinaetosulfato 20 mM, 10 µl de Triton X100 10% (v/v), 22 µl de H₂O e 25 µl do extrato etanólico (Nunes-Nesi et al., 2007). A leitura da absorvância foi feita cineticamente a 570 nm. Uma vez estabilizada a OD foram adicionadas sucessivamente 5 µl de malato desidrogenase dependente de NAD⁺ e 5 µl de fumarase.

O conteúdo de aminoácidos foi determinado na absorvância de 570 nm, segundo o protocolo descrito por Gibon et al., (2004). Foi utilizado um mix composto por 50 µl de tampão citrato 1M pH 5,2 com ácido ascórbico 0,2%, 25 µl do extrato etanólico, 25 µl de etanol 70% e 100 µl de solução de ninhidrina 1% (p/v em etanol 70%) por reação. O conteúdo de aminoácidos foi determinado utilizando uma curva padrão de leucina.

Caracterização estrutural

Para verificar as alterações anatômicas nas folhas das plantas expostas ao glifosato, amostras da região mediana e margem de folhas totalmente expandidas do terceiro nó dos diferentes tratamentos foram coletadas, fixadas em solução de Glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato, pH 7,2 (Karnovsky 1965, modificado), desidratadas em série etílica e incluídas em resina do tipo metacrilato (Historesin, Leica Instruments Heidelberg, Alemanha). Cortes transversais com 5 µm de espessura foram obtidos com auxílio de micrótopo rotativo de avanço automático (modelo RM2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, Illinois, USA) e corados com Azul de Toluidina a 0,05%, pH 4,7 (O'Brien e McCully, 1981).

Todas as lâminas permanentes foram montadas em Permout (Permout, Fisher Scientific, Bridgewater, NJ, USA), observadas e documentadas em microscópio de luz (modelo AX70RF, Olympus Optical, Tóquio, Japão), equipado com sistema de captura de imagens (Vision, Alemanha modelo Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss), localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Para análise em microscopia eletrônica de varredura, fragmentos com aproximadamente 1 centímetro de todos os tratamentos foram coletados e fixados em

solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,2 M; pH 7,2 (Karnovsky 1965, modificado), desidratadas em série etílica e submetidas ao ponto crítico de secagem usando CO₂ líquido (CPD 030 modelo, Bal-Tec, Liechtenstein), fixados sobre suportes metálicos e cobertos com ouro por meio de pulverização catódica usando metalizador (modelo FDU 010 modelo, Balzers, Liechtenstein). A documentação fotográfica foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (Leo, modelo 1430VP, Cambridge, Inglaterra), pertencente ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com base num esquema fatorial 2x5 com duas espécies, cinco tratamentos e cinco repetições. Um vaso com uma planta foi considerado uma unidade experimental, organizada em blocos randomizados ao acaso.

Os dados foram submetidos a análise de variância usando o software SAEG-Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (Euclides, 2004) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados

O conteúdo de ácido chiquímico no tecido foliar das duas espécies diferiu entre si nas três maiores doses aplicadas, sendo os maiores valores encontrados em *H. Chrysotricus*, quando comparada com *G. Gardneriana* (Figura 1) Entre os tratamentos, maiores valores foram encontrados nos tecidos foliares de *H. Chrysotricus* tratados com 1440 g ia ha⁻¹ do herbicida (Figura 1).

Em *H. chrysotrichus*, os sintomas visuais tornaram-se aparentes no 4 DAA a partir da dose de 720 g ia ha⁻¹, caracterizando regiões cloróticas as quais evoluíram para pontos necróticos amarronzados, sendo o centro mais claro que as bordas, ambos dispersos por toda a lâmina foliar (Figura 2 B). Aos 4 DAA, foi observado o início do enrolamento da bordas das folhas desta espécie (Figura 2 B). Em *H. Chrysotrichus*, os sintomas progrediram e aos 7 DAA, além de necroses foi observado o enrolamento total da folha (Figura 2 C) e abortamento de folhas mais jovens. Nas duas maiores doses aplicadas, os sintomas foram mais pronunciados havendo além de abortamento de folhas, morte da planta. *G. gardneriana* não apresentou sintomas visuais após a aplicação do herbicida em nenhuma das doses analisadas (Figura 2 D - F).

Avaliando o teor de nutrientes na matéria seca das plantas, os maiores valores foram encontrados em *H. chrysotrichus* para nitrogênio, fósforo, enxofre e potássio, este

último exceto nas doses de 360 e 720 g ia ha⁻¹(Figura 3). Entre os tratamentos, em *H. chrysotrichus*, a menor porcentagem de potássio foi encontrada na dose de 720 g ia ha⁻¹ (Figura 3 C), enquanto que em *G. gardneriana* maior porcentagem de desse mesmo elemento na matéria seca foi encontrado nas doses de 360 e 720 g ia ha⁻¹ (Figura 3 C).

Em relação às espécies analisadas, *H. chrysotrichus* apresentou maior valor da taxa de assimilação líquida de carbono (A) no controle e menor média na dose de 1080 g ia ha⁻¹ (Figura 4 A). Na condutância estomática (g_s) e na transpiração (E) o maior valor de *H. chrysotrichus* foi no controle (Figuras 4 B e 4 C). Na razão entre concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a), os maiores valores de *H. chrysotrichus* foram nas três últimas doses aplicadas (Figura 4 D). Entre os tratamentos, *H. chrysotrichus* apresentou o menor valor de A na dose de 1080 g ia ha⁻¹ (Figura 4 A) e maior valor de C_i/C_a na dose de 1080 g ia ha⁻¹ (Figura 4 D). O glifosato promoveu ainda decréscimo na média de g_s e E quando comparado com o controle (Figuras 4 B e 4 C). *G. gardneriana* não apresentou diferença entre as doses aplicadas do herbicida para os parâmetros A , g_s , E e C_i/C_a .

Quando comparamos as espécies, *H. chrysotrichus* teve o menor valor da eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), do *queenching* não fotoquímico (NPQ) e do *queenching* fotoquímico (Q_p) nas duas últimas doses avaliadas (Figura 5 B 5 C e 5 D). Para a taxa aparente de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR), a maior média foi encontrada no controle e menor na dose de 1080 g ia ha⁻¹ (Figuras 5 E). Entre os tratamentos, *H. chrysotrichus* teve o menor valor de F_o na última dose testada (Figura 5 A), de F_v/F_m , Q_p , NPQ e ETR nas duas últimas doses aplicadas (Figuras 5 B, 5 C, 5D e 5 E). *G. gardneriana* não apresentou diferença entre as doses aplicadas do herbicida para os parâmetros de fluorescência.

Glifosato induziu aumento na taxa de peroxidação de lipídeos nas folhas de *H. chrysotrichus* e *G. gardneriana*. Os valores foram maiores em *H. chrysotrichus*, quando comparado com *G. gardneriana* em todas as doses aplicadas, exceto no controle, onde ambas tiveram valores estatisticamente iguais (Figura 6). Quando comparamos entre os tratamentos, *H. chrysotrichus* apresentou maior peroxidação lipídica na maior dose do herbicida, seguida da terceira dose testada (Figura 6). Em *G. gardneriana*, os maiores valores de peroxidação lipídica foram encontrados nas doses de 720 e 1440 g ia ha⁻¹ (Figura 6).

Interessantemente, houve alterações nas atividades das enzimas do sistema antioxidativo. Catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e redutase da glutatona (GR) tiveram maior atividade em *G. gardneriana*

quando comparada com *H. chrysotricus*, ao passo que as peroxidases (POX) tiveram maior atividade em *H. chrysotricus* (Figura 7). Entre os tratamentos aplicados, *H. chrysotricus* apresentou os maiores valores de POX nas duas maiores doses aplicadas, sendo elas iguais entre si e GR apresentou maior atividade na ultima dose testada (Figura 7 B e 7 E). *G. gardneriana* teve a maior atividade da CAT, APX e GR na dose de 360 g ia ha⁻¹ (Figura 7A e 7E). POX apresentou maior atividade quando aplicada a dose de 720 g ia ha⁻¹(Figura 7 C e 7 D).

Maiores valores de Glicose, Frutose e Sacarose, clorofila a e total foram observados em *H. chrysotricus* (Figura 8) enquanto que maiores médias de amido, aminoácidos e fumarato foram observados em *G. gardneriana* (figura 9). Os valores Os valores de clorofila *b* nas três últimas doses avaliadas tiveram valores iguais entre as duas espécies (Figura 8) assim como os valores de malato nas três últimas doses do herbicida (Figura 9).

Entre os tratamentos, em *H. chrysotricus*, maiores valores de glicose foram encontrados nas três últimas doses aplicadas, as quais possuem médias iguais entre si. Maiores valores de frutose e sacarose foram obtidos na dose de 1440 g ia ha⁻¹, enquanto que a maior concentração de malato foi encontrada no controle quando comparado com os demais tratamentos e os valores de clorofila *a* e total na dose de 360 g ia ha⁻¹. Em *G. gardneriana*, o maior valor de aminoácidos foi encontrado na dose de 1440 g ia ha⁻¹.

Nas folhas de *H. chrysotricus*, a epiderme é unisseriada (Figura 10 C) e hipoestomática (Figura 10 E), com estômatos distribuídos uniformemente pela lâmina foliar. Tricomas glandulares (Figuras 10 C) e tectores (Figuras 12 A e 12 C) estão distribuídos na epiderme de ambas as faces da folha. O mesofilo é heterogêneo, formado por duas a três camadas de parênquima paliçádico e três a quatro camadas de parênquima lacunoso (figura ¹⁰ C). Na nervura central das folhas expostas ao herbicida glifosato, houve retração do protoplasto das células parenquimáticas próximas ao feixe vascular (Figura 10 B). No limbo foliar houve o aparecimento de regiões necróticas na epiderme da face adaxial (Figura 10 D), as quais progrediram para o mesofilo (Figura 10 D), formando meatos os quais comprometeram todo o mesofilo (figura 10 E e 10 F). As células da epiderme e do parênquima da nervura de segunda ordem plasmolizaram-se, comprometendo sua funcionalidade (Figura 9 F).

A nervura principal das folhas de *G. gardneriana* apresenta contorno biconvexo (Figura 11 A). O parênquima cortical apresenta células ovais e circulares e com paredes delgadas (Figura 11 A). O sistema vascular é formado por um feixe central, em forma de semi-arco fechado constituído por cinco a seis séries de xilema secundário dispostos

radialmente, envolvidas por floema e externamente por fibras (Figura 11 A). Além disso, são observados de um a três canais secretores (Figura 11 A).

A lâmina foliar apresenta epiderme uniestratificada em ambas as faces com as suas paredes periclinais externas revestidas por uma cutícula lisa e espessa (Figura 11 C). O mesofilo é heterogêneo, sendo o parênquima paliçádico constituído de duas a três camadas de células e o lacunoso de oito a dez camadas com células de tamanhos variados e espaços irregulares (Figura 11 E). Canais secretores são observados interrompendo eventualmente o parênquima (Figura 11 C).

As folhas de *G. gardneriana* quando expostas ao herbicida glifosato apresentaram alterações anatômicas. Na nervura mediana, houve o rompimento e colapso das células do parênquima, formando grandes meatos (Figura 11 B). Tanto na face abaxial quanto adaxial da nervura principal em algumas regiões houve o rompimento da cutícula (Figuras 11 B e 11 G). No feixe vascular, foi possível observar deformação dos elementos de vaso do xilema (Figura 11 H). Na epiderme, houve o desgaste da cutícula (Figura 11 D). No parênquima paliçádico e lacunoso, houve o rompimento de células (Figura 11 D), formando meatos por todo o limbo foliar (Figuras 11 F e 11 I), comprometendo a atividade do tecido.

Micromorfológicamente é possível observar que a superfície abaxial de *H. chrysotricus* apresenta grande densidade de tricomas secretores (Figura 12 A) e possui também tricomas tectores (Figura 12 A). As células epidérmicas propriamente ditas são sinuosas e de padrões irregulares (Figura 12 A). Na face adaxial da folha, a frequência de ambos os tipos de tricomas é menor (Figura 12 C). Na face abaxial das folhas de *H. chrysotricus* expostas ao herbicida glifosato, houve descamação da cera epicuticular a qual se desprende de grandes regiões da lâmina foliar e obliterou estômatos (Figura 12 B). Na epiderme da face adaxial da folha desta espécie, houve também descamação de cera epicuticular e plasmólise celular, as quais refletiram numa perda dos contornos das superfícies destas células e conseqüentemente no relevo foliar (Figura 12 D).

Micromorfológicamente, *G. gardneriana* apresenta contornos celulares ondulados na epiderme da face abaxial da folha (figura 13 A), com cera epicuticular abundante também na face adaxial da folha (figura 13 B). Quando expostas ao herbicida glifosato, as folhas de *G. gardneriana* na superfície abaxial perdem as projeções das ceras (Figura 13 D, 13 G e 13 H), as quais por se desprenderem, podem obliterar os estômatos (Figura 13 C). Na epiderme da face adaxial da folha, houve descamação de placas da cera epicuticular (figuras 13 E e 13 F), as quais também obliteraram estômatos.

Discussão

É bem definido que o glifosato causa a morte da planta por diminuir a atividade da enzima cloroplastídica 5-enolpiruvilshikimate 3-phosphate sintase. Mas os mecanismos que provocam a morte do vegetal podem estar relacionados a fatores indiretos que ele desencadeia fisiologia e bioquímica da planta. Por isso, estudos com este enfoque são justificáveis por fornecer informações complementares e atuais sobre a ação de uma das moléculas mais utilizadas na agricultura e seus efeitos em espécies que não são alvos de sua aplicação.

Houve acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos foliares de *H. Chrysotricus*, indicando que mesmo após um curto intervalo de aplicação, o herbicida é capaz de promover alterações na atividade da enzima cloroplastídica EPSPS. O principal composto acumulado após tratamento com glifosato é ácido chiquímico, de forma que outros trabalhos utilizam este parâmetro para indicar a ação deste herbicida na planta (Lydon e Duke, 1988; Hernandez et al., 1999).

O glifosato é um forte quelador e afeta a nutrição mineral da planta por promover a imobilização e translocação de íons essenciais como magnésio, manganês e ferro pelo vegetal (Cakmak et al., 2009; Zobiole et al., 2011). De forma contraditória, nas doses intermediárias, houve aumento na porcentagem de potássio na matéria seca de *G. gardneriana*. Potássio e Cálcio estão associados à abertura e fechamento estomático (Mateos-Naranjo et al., 2008). Redução de A e g_s pode ter promovido um desequilíbrio na razão k/Ca das células guardas dos estômatos o que aumentou os níveis de K.

Glifosato é capaz de afetar a fotossíntese de forma indireta, por inibir a biossíntese de carotenoides, clorofila, aminoácidos e quinonas (Dewick, 1998; Fedtke e Duke, 2005) e por promover deficiência de nutrientes como ferro, magnésio e manganês (Bellaloui et al., 2009; Cakmak et al., 2009). O teor de clorofila foi alterado nas duas espécies quando tratadas com o herbicida. Diversos autores relataram a diminuição do conteúdo de clorofila após a aplicação do herbicida devido a degradação ou inibição da sua biossíntese (Mateos Naranjo et al., 2009; Zobiole et al., 2011). Uma vez metabolizado, o glifosato se decompõe em Ácido Metil Fosfórico (AMPA). Devido a sua similaridade com a glicina, o AMPA compete com ela em rotas bioquímicas, afetando a biossíntese de clorofila e conseqüentemente os processos fotossintéticos (Gomes et al., 2014).

Embora não seja o primeiro local de ação do herbicida, alterações nas taxas fotossintéticas vêm sendo descritas como consequência da aplicação deste por diversos autores (Zobiole et al., 2009; Olesen e Cedergreen, 2010; Mateos-Naranjo e Perez-

Martin, 2013). Neste estudo, *H. Chrysotricus* quando tratada com o herbicida, teve a assimilação líquida de carbono, condutância estomática e transpiração reduzidas, ao passo que se observou uma redução razão C_i/C_a na dose de 360 g ia ha⁻¹ seguida de aumento a partir da dose de 720 g ia ha⁻¹. A inibição na taxa de assimilação líquida de carbono causada pelo glifosato na dose de 360 g ia ha⁻¹, pode ser atribuída a uma limitação estomática, assegurada pela queda nos valores de g_s e C_i/C_a . Entretanto, nas doses subsequentes o valor de C_i/C_a aumenta, indicando que a queda na assimilação de carbono passa a ser também em virtude de uma limitação bioquímica. Flexas et al. (2008) descreveram que limitações na síntese de clorofila e variações na condutância foram um dos fatores que contribuíram para a redução de *A*. Ashan et al., (2008) revelaram que o glifosato é capaz de limitar a síntese de três proteínas que compõe as subunidades da Rubisco. A diminuição na fixação de carbono por diminuição na regeneração da Rubisco é uma resposta para o decréscimo nos valores de assimilação de carbono em plantas tratadas com o herbicida. Pereira et al. (2009), descreveram que obliteração mecânica nos estômatos de *C. hilariana* provocou aumento da temperatura foliar e diminuição de g_s , sendo este um dos fatores que provocou a diminuição de *A* naquela espécie. Obliteração dos estômatos por cera epicuticular foi uma das alterações anatômicas encontradas neste trabalho, podendo esta ser a limitação não bioquímica que provocou a redução de *A* em *H. Chrysotricus*.

Glifosato diminuiu os níveis da razão F_v/F_m , de NPQ, QP e ETR, ao passo que F_o teve o seu maior valor nas doses de 720 e 1080 g ia ha⁻¹ em *H. Chrysotricus*. A redução significativa de F_o e F_v/F_m em *H. Chrysotricus* indica que nesta espécie houve fotoinibição. glifosato compromete a biossíntese de aminoácidos essenciais, e logo afeta a abundância de proteínas associadas ao PSII, o que pode justificar o decréscimo na taxa aparente de transporte de elétrons (Vivancos et al., 2011).

Por ser um forte quelador de íons (Cakmak et al., 2009), o herbicida pode ainda influenciar na disponibilidade de Mn comprometendo a atividade da cadeia transportadora de elétrons, diminuindo ETR. A EPSPS é uma enzima cloroplastídica, sendo esta organela o primeiro alvo de estresse oxidativo causado pelo herbicida.

O rompimento de membranas causado pelo excesso de ROS pode danificar os pigmentos do complexo antena, diminuir a concentração deles e influenciar negativamente a cadeia transportadora de elétrons, diminuindo as funções fotossintéticas e a relação F_v/F_m (Mishra et al., 2014). A diminuição de Qp indica que o herbicida provocou baixa eficiência na dissipação de energia na forma fotoquímica (Fracheboud e Leipner, 2003) o que sugere que a diminuição nos níveis fotossintéticos

pode ser também em virtude de uma menor produção de poder redutor. Entretanto, houve também redução nos níveis de NPQ, um mecanismo que protege o PSII através da dissipação do excesso de energia, revelando que *H. Chrysotricus* apresenta uma baixa eficiência na dissipação na forma principalmente de calor (Rosenqvist e Kooten et al., 2003), o que pode ter promovido uma grande produção de ROS nesta espécie, podendo ser este um dos motivos do estresse causado pelo herbicida ter sido mais pronunciado nela.

O maior valor de MDA encontrado em *H. Chrysotricus* foi cinco vezes maior do que aquele encontrado no controle, ao passo que em *G. gardneriana* esse valor foi três vezes maior, evidenciando que o glifosato desencadeia processos bioquímicos que promoveram o acúmulo de ROS as quais provocaram a peroxidação das membranas celulares (Ahsan et al., 2008). Um dos mais importantes indicativos da ocorrência de danos celulares é o aumento da peroxidação de lipídeos, mensurado através do aumento dos níveis de MDA nos tecidos (Sinha e Saxena 2006; Gil e Tuteja, 2010). Ocorrência de estresse oxidativo foi mensurada pelo aumento de peroxidação lipídica em folhas de arroz e milho tratadas com o herbicida (Sergiev et al., 2006; Ahsan et al., 2008). Espécies mais sensíveis apresentam um sistema de defesa antioxidativo menos eficiente e, portanto uma menor proteção contra os danos oxidativos (Simova-Stoilova, 2010) e por isso maiores valores de peroxidação lipídica são encontrados nestes organismos.

Interessantemente, as folhas de *G. gardneriana* apresentaram maior atividade enzimática do que as folhas de *H. Chrysotricus*. Houve aumento na atividade de CAT, POX, APX e GR, nas plantas expostas ao glifosato em *G. gardneriana*, ao passo que em *H. Chrysotricus* houve aumento da atividade de POX e GR, sugerindo que as espécies estudadas utilizam este mecanismo de defesa antioxidante contra o estresse provocado por glifosato, conforme observado por outros autores trabalhando com glifosato em diferentes espécies (Ahsan et al., 2008; Romero et al., 2011).

Uma vez que houve maior atividade das enzimas antioxidantes nas folhas de *G. gardneriana*, é possível que esta espécie tenha uma maior capacidade antioxidante e por isso menores valores para a peroxidação lipídica foram encontrados, o que refletiu em danos anatômicos menos severos e na ausência de sintomas visuais. Guo et al. (2007), descreveram que cultivares de arroz menos sensíveis ao Paraquat apresetaram maiores atividades de SOD e GR quando comparado com aquele considerado mais sensível.

De forma contrária, o aumento da atividade da POX e GR não foram suficientes para limitar a ocorrência da peroxidação lipídica em *H. Chrysotricus* e nem a progressão dos danos os quais culminaram com aparecimento de sintomas visuais e a morte da

planta. Existem duas rotas para eliminação de ROS: a maior atividade de SOD/CAT e o ciclo ascorbato glutationa (Foyer et al; 1994). Em *H. Chrysotricus* não houve aumento na atividade em SOD e CAT e foi esta a espécie que desenvolveu os danos mais pronunciados, sugerindo que esta primeira rota de defesa enzimática desempenha um papel crucial para a atenuação do estresse provocado pelo glifosato.

Os efeitos do glifosato vêm sendo estudados com uma abordagem molecular, proteômica e metabolômica (Ahsan et al., 2009; Trenkamp et al., 2009) Entretanto, o panorama completo das consequências metabólicas causadas pela inibição da EPSPS ainda não foram totalmente elucidadas. A exposição foliar de *H. Chrysotricus* ao herbicida glifosato provocou acúmulo de carboidratos neste órgão. Interessantemente, houve diminuição na taxa fotossintética desta espécie e danos anatômicos considerados severos foram observados, inclusive com comprometimento das nervuras foliares, sugerindo que o acúmulo de carboidratos na folha ocorra por impedimento físico na translocação de fotoassimilados. Outros autores já descreveram o acúmulo de carboidratos como consequência do tratamento com glifosato (Fuchs et al., 2002; Olesen e Cedergreen, 2010). A biossíntese de aminoácidos depende do metabolismo de carboidratos como fonte dos substratos iniciais (Jensen, 1986), sendo que 20% do carbono fixado pelas plantas é direcionado para a rota do ácido chiquímico (Olesen e Cedergreen, 2010). Assim, alterações nesta via em virtude de modificações no funcionamento da EPSPS, desregula o fluxo de carbono, podendo provocar acúmulo na fonte em virtude da não utilização desta molécula nos níveis esperados (Jensen 1986).

Embora a principal consequência do uso do glifosato seja diminuir a produção de aminoácidos essenciais, por alterar a síntese de corismato, observou-se aumento na concentração de aminoácidos livres em *G. gardneriana* quando tratada com 1440 g ia ha⁻¹, revelando que a exposição ao herbicida leva ao aumento do *pool* de aminoácidos livres. É possível que este aumento tenha ocorrido em virtude do aumento da proteólise. A rápida degradação e lenta síntese *de novo* pode mascarar a diminuição da produção de aminoácidos induzida pelo herbicida. Este resultado está de acordo com dados existentes na literatura não somente analisando o herbicida glifosato, mas também inibidores de Acetolactato sintase (Orcaray et al., 2010; Zulet el al., 2013).

Maiores doses de malato foram encontradas no controle de *H. chrysotricus*, revelando que o herbicida afetou negativamente a síntese desse ácido dicarboxílico. É possível que as alterações encontradas no metabolismo do carbono nessa espécie tenha afetado os passos iniciais da glicólise e a posterior produção do ácido. Malato é um importante regulador de abertura estomática (Lee et al., 2008; Fernie e Martinoia,

2009). Menores valores nas plantas tratadas, junto de decréscimo da porcentagem de K podem ter influenciado a g_s nesta espécie.

O estresse causado por glifosato provocou desordens bioquímicas e fisiológicas nas plantas as quais refletiram micromorfologia das duas espécies de diferentes maneiras, além de induzir o aparecimento de sintomas em *H. Chrysotricus*. Parâmetros sintomatológicos são usuais para monitorar o estresse causado por poluentes (Louback et al., 2016). Estudos micromorfológicos são imprescindíveis uma vez que podem prever a presença do dano, como ocorreu com *G. gardneriana*, espécie que mesmo não apresentando sintoma visual, teve alterações anatômicas e micromorfológicas ou ainda indicar qual a real extensão do dano causado não só por herbicida, mas também por outros poluentes (Sant'Anna- Santos e Azevedo, 2007; Freitas-Silva et al., 2016).

Em *H. Chrysotricus* houve abortamento dos meristemas apicais do caule e também de folhas mais jovens, mesmo antes do aparecimento dos sintomas visuais. Uma vez que o herbicida é absorvido, ele penetra nos tecidos foliares e há translocação através dos tecidos vasculares até regiões metabolicamente ativas como meristemas apicais e folhas jovens (Monquero et al., 2004). Por se um local de alta atividade metabólica, o estresse foi mais pronunciado, além disso, a sensibilidade de um vegetal está diretamente relacionada ao seu estágio de desenvolvimento, de forma que órgãos mais jovens são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos por não apresentarem o seu mecanismo de defesa totalmente desenvolvido (Liu et al., 2005).

O aparecimento de cloroses em *H. chrysotricus* no quarto dia de tratamento pode ser justificado pela perda parcial de pigmentos fotossintetizantes encontrados nesta espécie. Regiões necróticas surgiram nas folhas a partir da dose de 720 g ia ha⁻¹. Micromorfológicamente foi possível observar que a necrose teve início na epiderme da face adaxial da folha, comprometendo as células epidérmicas e houve progressão até o parênquima paliádico, colapsando células deste tecido. Outros autores já descreveram o aparecimento de diferentes padrões de necroses em espécies expostas a poluentes atmosféricos (Silva et al., 2005; Sant'Anna-Santos et al., 2006; Oliveira et al., 2007).

Mesmo na ausência de necroses, houve a formação de grandes meatos pelo mesofilo de *H. chrysotricus* nas maiores doses de herbicida utilizadas: 1080 e 1440 g ia ha⁻¹, comprometendo a funcionalidade do parênquima clorofiliano. Uma vez que ocorre a absorção pela cutícula, o deslocamento do herbicida segue o fluxo dos fotoassimilados (Galon et al., 2013). Interessantemente, a presença destes meatos ocorreu principalmente próximo as nervuras, sugerindo que o herbicida é capaz de provocar alterações nesta espécie durante a absorção e também translocação. O parênquima

clorofiliano é o principal tecido fotossinteticamente ativo da folha (Dos Anjos et al., 2015); alterações no volume e forma destas células, bem como no conteúdo de cloroplastos e proteínas envolvidas na fotossíntese podem comprometer a regulação da difusão de gases dentro da folha (Flexas et al., 2008). Esse é um dos fatores que justifica a diminuição da taxa fotossintética de *H. chrysotricus* quando exposta ao glifosato.

Em *H. chrysotricus*, houve plasmólise celular no limbo foliar. Na dose mais elevada, esse processo ocorreu também na nervura de segunda ordem, comprometendo a funcionalidade da folha. Plasmólise e retração do protoplasto evidentes nesta espécie se justifica pela ocorrência da peroxidação lipídica também confirmada nesse estudo e descrita em outros trabalhos como causa de alteração na anatomia (Masher et al., 2002; Campos et al., 2014).

Em *G. gardneriana*, além do aparecimento de meatos, houve o rompimento da cutícula tanto no limbo quanto na nervura principal, podendo este ser mais uma via de entrada do herbicida. Além disso, nesta espécie foi possível observar um aspecto distorcido do xilema. O comprometimento da rota do ácido chiquímico pelo herbicida compromete a produção de compostos do metabolismo secundário, como por exemplo a lignina (Aharoni e Galili, 2011), o que justifica as alterações encontradas no xilema nesta espécie.

Microscopicamente, a plasmólise provoca alteração nos padrões das células epidérmicas as quais aparecem menos túrgidas, alteração que ocorreu principalmente na epiderme da face abaxial da folha de *H. chrysotricus* e na epiderme da face adaxial da folha de *G. gardneriana*. Rompimento da cera epicuticular foi outra desordem micromorfológica encontrada nas folhas das duas espécies quando expostas ao herbicida, sendo que nas duas espécies, porções da cera epicuticular rompida obliteraram estômatos. Obliteração de estômatos pode ser uma limitação mecânica que altera a condutância, alterando os valores de C_i/C_a (Pereira et al., 2009) e consequentemente comprometendo a assimilação de carbono, como verificado em *H. chrysotricus*.

A presença de tricomas está relacionada com aumento da sensibilidade de espécies vegetais a poluentes atmosféricos (Azevedo 1995; Chaves et al., 2002), por criar um micro ambiente capaz de adsorver uma maior quantidade do poluente e promover um maior tempo de retenção, aumentando as possibilidades de danos, especialmente a cerca dos tricomas, tendo em vista as células da base desses apêndices são mais permeáveis (Azevedo, 1995). A folha de *H. chrysotricus* apresenta uma grande quantidade de tricomas. É possível que esta seja a característica anatômica que mais

influenciou na sensibilidade acentuada desta espécie quando tratada com o herbicida glifosato.

Conclusão

As doses usuais do glifosato provocam alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas em espécies não agricultáveis. Aumento na produção de ROS, na atividade das enzimas do sistema antioxidativo e na fisiologia e fluorescência da clorofila *a* podem ser consideradas biomarcadoras da presença do herbicida no ambiente.

H. chrysotricus foi a espécie mais sensível por apresentar alterações consideradas mais severas. As características anatômicas da folha, além de um sistema antioxidativo pouco eficiente podem justificar essa afirmação. Distúrbios na fluorescência da clorofila *a* em *H. chrysotricus* revelam que esta espécie tem uma menor eficiência para dissipação do excesso de energia quando submetida a estresse, o que influenciou nas taxas fotossintéticas e no aumento da produção de ROS evidenciadas pela peroxidação das membranas.

A fotossíntese, embora não seja alvo primário do herbicida, apresentou grandes alterações, o que influenciou o metabolismo geral da planta. A presença de sintomas visuais mesmo quando utilizadas doses intermediárias, sugerem que *H. chrysotricus*, além de ter desenvolvido os biomarcadores acima descritos, pode também ser utilizada como bioindicadora de locais impactados pelo herbicida glifosato.

Referências bibliográficas

Aharoni A, Galili G (2011) Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Curr Opin Chem Biol* 22: 239–244

Ahsan N, Lee DG, Lee KW, Alam I, Lee SG, Bahk JD, Lee BH (2008) Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 1062–1070

Araújo TO, Freitas-Silva L, Santana BVN, Kuki KN, Pereira EG, Azevedo AA, Silva LC (2014) Morphoanatomical responses induced by excess iron in roots of two tolerant grass species. *Environ Sci Pollut Res* 22 (3):2187–2195

Azevedo, AA (1995) *Ação do flúor, em chuva simulada, sobre a estrutura foliar de Glycine max (L.) Merrill* tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Basantani M, Srivastava A, Sen S (2011) Elevated antioxidant response and induction of tau class glutathione S-transferase after Glyphosate treatment in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99:111–117

- Bellaloui N, Reddy KN, Zablotowicz RM, Abbas, Abel CA (2009) Effects of Glyphosate on seed iron and root ferric (III) reductase in soybean cultivars, *J. Agric. Food Chem.* 57:9569–9574
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25:173-185
- Bilger W, Schreiber U, Bock M (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Ecologia* 102:425-432
- Boutin, C (2013) Herbicides: non-target species effect. In: Jorgensen, S.E. (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Management*, vol II. Taylor and Francis, New York, pp. 1406:1417
- Boutin C, Strandberg B, Carpenter D, Mathiassen SK, Thomas PJ (2014) Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications? *Environmental Pollution* 185:295-306
- Bradford MM (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
- Brecke BJ, Duke WB (1980) Effect of Glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. *Plant Physiol* 66:656–659
- Cakmak I, Yazici A, Tutus Y, Ozturk L (2009) Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non Glyphosate resistant soybean. *Eur. J. Agron* 31: 114–119
- Calberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113:484-495 1985
- Campos NV, Loureiro ME, Azevedo AA (2014) Differences in phosphorus translocation contributes to differential arsenic tolerance between plants of *Borreria verticillata* (Rubiaceae) from mine and non-mine sites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21: 5586–5596
- Caseley JC, Coupland D (1985) Environmental and plant factors affecting Glyphosate uptake movement and acidity. In: Grossbard, E; Atkinson, DA (Ed.). *The herbicide Glyphosate*. London: Butterworths. P. 92-123
- Cataneo AC, Destro GFG, Ferreira LC, Chmha, HL, Sousa DCF (2003) Atividade da glutatona S-transferase na degradação do herbicida Glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). *Planta Daninha* 21(2):307-312
- Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2:764-775

Chaves ALF, Silva EAM, Azevedo AA, Oliva MA, Matsuoka K (2002), Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (capim-Rhodes) – Poaceae. *Acta Botanica Brasílica*, **16**: 395-406

Dai P, Hu P, Tang J, Li Y, Li C (2016) Effect of Glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta Histochemica* 118:519-526

De Temmerman L, Bell JNB, Garrec JP, Klumpp A, Krause GHM, Tonneijck AEG (2004) Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. In: Klumpp A, Ansel W, Klumpp G (Ed.). *Urban air pollution, bioindication and environmental awareness*. Göttingen: Curvillier p.337-373

DosAnjos L, Oliva MA, Kuki KN, Mielke MS, Vetrella MC, Galvão MF, Pinto LRM (2015) Key leaf traits indicative of photosynthetic plasticity in tropical tree species. *Trees* 29:247–258

El- Sayed OM, El- Gammal OHM, Salama ASM (2014) Effect of ascorbic acid, proline and jasmonic acid foliar spraying on fruit set and yield of Manzanillo olive trees under salt stress. *Scientia Horticulturae* 32–37

Euclides, RF (2004) System for Statistical (SAEG 9.0). Fundação Arthur Bernardes-UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Fedtko K, Duke S (2005) Herbicides. In: Hock B, Elstner E, eds. *Plant toxicology*. New York: Marcel Dekker, 247–330

Fernie AR, Martinoia E (2009) Malate: jack of all trades or master of a few? *Phytochemistry* 70:828–832

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212: 250-263

Flexas J, Ribas-Carbo M, Diaz-Espejo A, Galmes J, Medrano H (2008) Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ.* 31:602–621

Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant* 92: 696-717

Fracheboud Y, Leipner J (2003) The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress, in: J. DeEll, P. Toivonen (Eds.), *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 125-150

Freitas-Silva L, Araújo TO, Silva LC, Oliveira JA, Araújo JM (2016) Arsenic accumulation in Brassicaceae seedlings and its effects on growth and plant anatomy. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124:1–9

- Fuchs MA, Geiger DR, Reynolds TL, Bourque JE (2002) Mechanisms of Glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medikus). *Pest Biochem Physiol* 74:27–39
- Galon L, Ferreira EA, Aspiazú I, Concenço G, Silva AF, Silva AA, Vargas L (2013) Glyphosate Translocation in Herbicide Tolerant Plants. *Planta Daninha* 31: 193-201
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990:87-92
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59:309-314
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Hoehne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: Comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* 16:3304-3325
- Gill SS, Anjun NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N (2013) Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70:204-212
- Gill, SS, Tuteja, N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12):909-930
- Gomes MP, Smedbol E, Chalifour A, Hénault-Ethier L, Labrecque M, Lepage L, Lucotte M, Juneau P (2014) Alteration of plant physiology by Glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany* 60:1-13
- Guo Z, Huang M, Lu S, Yaqing Z, Zhong Q (2007) Differential response to paraquat induced oxidative stress in two rice cultivars on antioxidant and chlorophyll a fluorescence. *Acta Physiol Plant* 29:39–46
- Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84:450-455
- Hernandez A, Garcia-Plazaola JI, Becerril JM (1999) Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J Agric Food Chem* 47:2920-2925
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The waterculture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 32 p.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604-611
- Jensen RA (1986) The shikimate arogenate pathway – link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiol Plant* 66:164–168. Baixar esse tbm

- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*.57:315-319
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* 79:209–218
- Lee M, Choi Y, Burla B, Kim YY, Jeon B, Maeshima M, Yoo JY, Martionioia E, Lee Y (2008) The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nat. Cell Biol* 10: 1217–1223
- Liu X, Zhang S, Shan X, Zhu YG (2005) Toxicity of arsenate and arsenite on germination seedling growth and amyolyticactivity of wheat. *Chemosphere* 61:293–301
- Louback E, Pereira TAR, de Souza SR, Oliveira JA, Silva LC (2016) Vegetation damage in the vicinity of an aluminum smelter in Brazil. *Ecological Indicators* 67:193–203
- Lydon J, Duke SO (1988) Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *J Agric Food Chem* 36:813–818
- Mascher R, Lippmann B, Holzinger S, Bergmann H (2002) Arsenate toxicity, effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci.*163: 961–969
- Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA (1989) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba, Potafos. 201p
- Mateos-Naranjo E, Perez-Martin A (2013) Effects of sub-lethal Glyphosate concentrations on growth and photosynthetic performance of non-target species *Bolboschoenus maritimus*. *Chemosphere* 93:2631–2638
- Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Cambrollé J, Luque T, Figueroa E (2008) Growth and photosynthetic responses to zinc stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Plant Biology* 10:754-762
- Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Cox L, Cornejo J, Figueroa ME (2009) Effectiveness of Glyphosate and imazamox on the control of the invasive cordgrass *Spartina densiflora*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1694–1700
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment* 33: 453–467

- Mishra S, Starkb H-J, Kupper H (2014) A different sequence of events than previously reported leads to arsenic-induced damage in *Ceratophyllum demersum* L. *Metallomics* 6: 444-454
- Mittler, R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410
- Monquero PA, Christoffoleti PJ, Osuna MD, De Prado RA (2004) Absorção, translocação e metabolismo do Glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. *Planta Daninha* 22:445–451
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AM, Loureiro ME, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol* 137:611–622
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J* 50:1093–1106
- O'Brian PP, McCully ME (1981) The study of plants structure principles and select methods. Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltda. 45p
- Olesen CF, Cedergreen N (2010) Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Pest Manag Sci* 66:536–542
- Oliveira CRM, Oliva MA, Pereira EG (2007) Efeito do Material Particulado de Ferro no Teor de Pigmentos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Brasileira de Biociências* 2: 681-683
- Orcaray L, Igai M, Marino D, Zabalsa A, Royuela M (2010) The possible role of quinate in the mode of action of Glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science* 66:262-269
- Orcaray L, Zulet A, Zabalza A, Royuela M (2012) Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide Glyphosate. *Journal of Plant Physiology* 169:27– 33
- Oxborough K, BaKer NR (1997) An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at cellular and subcellular levels. *Plant, Cell and Environment* 20:1473–1483
- Peixoto PHP, Pimenta DS, Antunes F (2005) Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40:727-734
- Pereira EG, Oliva MA, Kuki KN, Cambraia J (2009) Photosynthetic changes and oxidative stress caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. *Trees* 23:277–285

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975: 384–394

Romero DM, Molina MCR, Juárez AB (2011) Oxidative stress induced by a commercial Glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 741–747

Rosenqvist E, Van Kooten O (2003) Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature, in: J.R. Dell, P.M.A. Toivonen (Eds.), *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 31 e 77

Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA (2007) Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. *Rev. Bras. Biociênc* 5: 48–50

Sant'Anna - Santos BF, Silva LC, Azevedo AA, Aguiar R (2006) Effects of Simulated Acid Rain on Leaf Anatomy and Micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 313:321

Santos BM, Gilreath JP, Esmel CE, Siham MN (2007) Effects of sublethal Glyphosate rates on fresh market tomato. *Crop Protection* 26:89–91

Santos SA, Tuffi-Santos LD, Sant'Anna-Santos BF, Tanaka FAO, Freitas-Silva L, Júnior AS (2015) Influence of shading on the leaf morphoanatomy and tolerance to Glyphosate in *Commelina benghalensis* L. and *Cyperus rotundus* L. *Australian Journal of Crop Science* 9:135-142

Sergieiev IG; Alexieiva VS, Ivanov SV, Moskova II, Karanov EN (2006) The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against Glyphosate action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85: 139–146

Silva LC, Oliva MA, Azevedo AA, Arajo JM, Aguiar RM (2005) Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in Restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. *Water, Air, and Soil Pollution* 168: 129–143

Simova-Stoilova L, Vaseva I, Grigorova B, Demirevska K, Feller U (2010) Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 200-206

Singh BK, Shaner DL (1998) Rapid Determination of Glyphosate Injury to Plants and Identification of Glyphosate -Resistant Plants. *Weed Technology* 12: 527-530

Sinha S, Saxena R (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside—a content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62:1340–1350

Trenkamp S, Eckes P, Busch M, Fernie AR (2009) Temporally resolved GC–MS-based metabolic profiling of herbicide treated plants reveals that changes in polar primary

metabolites alone can distinguish herbicides of differing mode of action. *Metabolomics* 5:277–91

Tuffi-Santos LD, Wagner Junior A, Silva JOC, Pimentel LD, Santos CEM, Bruckner CH, Ferreira FA (2006) Deriva de herbicidas e efeito de fungicida x herbicida em plantas jovens de pessegueiro. *Planta Daninha* 24(3):505-512

Vivancos PD, Driscoll SP, Bulman CA, Ying L, Emami K, Treumann A, Mauve C, Noctor G, Foyer C (2011) Perturbations of Amino Acid Metabolism Associated with Glyphosate -Dependent Inhibition of Shikimic Acid Metabolism Affect Cellular Redox Homeostasis and Alter the Abundance of Proteins Involved in Photosynthesis and Photorespiration. *Plant Physiology* 157:256-268

Yannicari M, Tamussi E, Istilart C, Castro AM (2012) Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry* 57:210-217

Zobiolo LHS, Oliveira-Jr RS, Morgan HD, Constantin J, Castro C, Oliveira F, Oliveira Jr A (2009) Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in Glyphosate -resistant soybeans. *Plant Soil*. 328:57–69

Zobiolo LHS, Kremer RJ, Oliveira-Jr RS, Constantin J (2011) Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” Glyphosate to-resistant soybean (*Glycine max* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99: 53–60

Zulet A, Gil - Monreal M, Villamor JG, Zabalza A, Van - der - Hoorn RAL, Royuela M (2013) Proteolytic Pathways Induced by Herbicides That Inhibit Amino Acid Biosynthesis. *Plos One* 8: 1-9

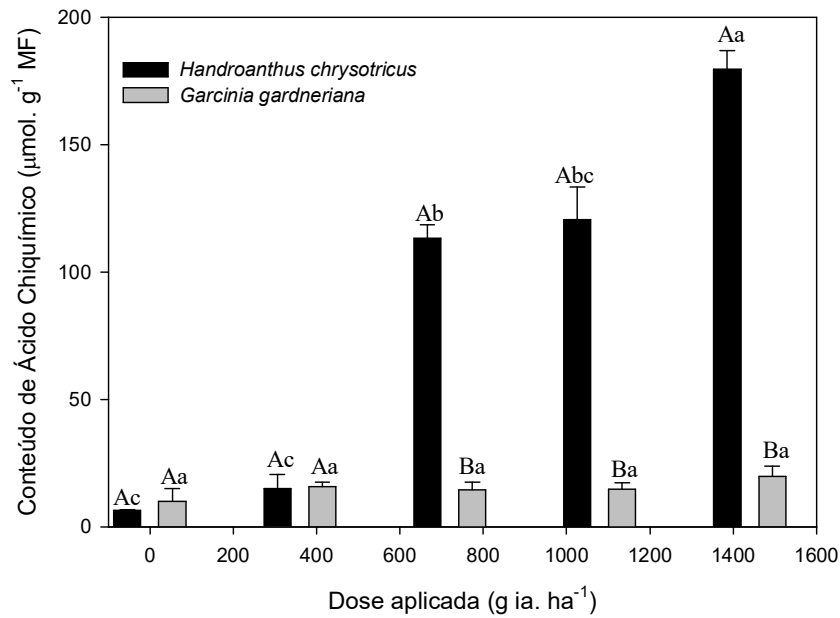


Figura 1- Conteúdo de ácido chiquímico presente na matéria fresca das folhas de *Handroanthus chrysotricus* e *Garcinia gardneriana* após 72 horas após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam tratamentos numa mesma espécie. (n=5).

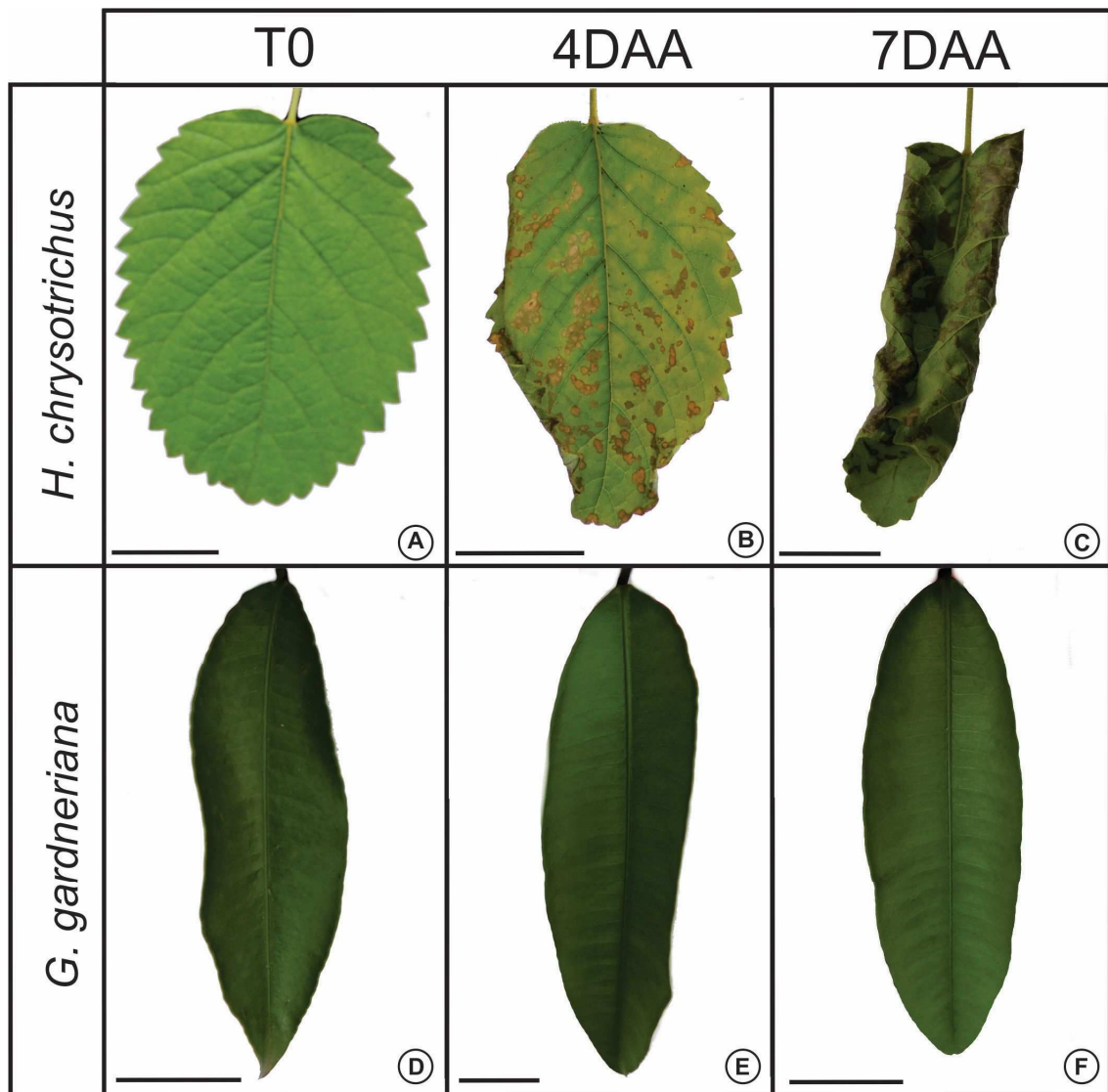


Figura 2- Caracterização visual de folhas de *Handroanthus Chrysotrichus* (A, B e C) e *Garcinia Gardneriana* (D, E e F) submetidas a 1440g ia ha⁻¹ herbicida glifosato. T0 (A e D), imediatamente antes da aplicação do herbicida, 4 DAA (B e E) e 7 DAA (C e F) B- enrolamento da margem foliar e a presença de pontos cloróticos e necróticos dispersos por todo o limbo. C- Enrolamento total do limbo foliar e presença de pontos necróticos

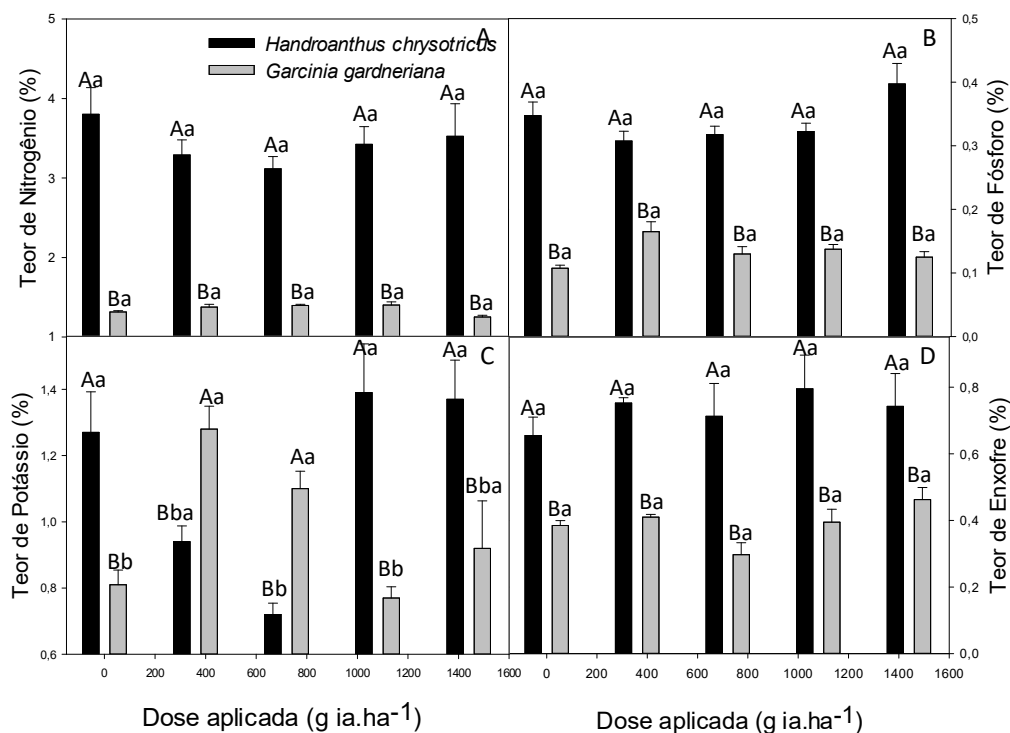


Figura 3- Teor de Nitrogênio (A), Fósforo (B), Potássio (C) e Enxofre (D) na matéria seca das folhas de *Handroanthus chrysotricus* e *Garcinia gardneriana* 7 dias após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam tratamentos numa mesma espécie. (n=5).

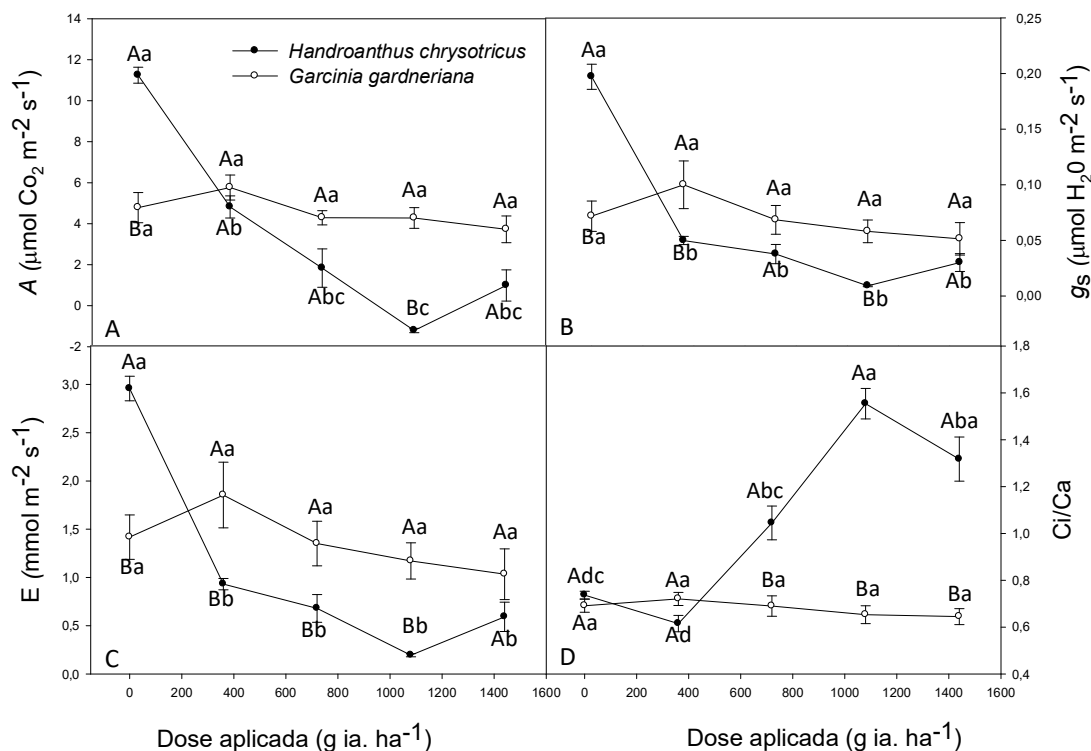


Figura 4- A- Taxa de assimilação líquida de carbono (A); B- Condutância estomática (g_s); C-Transpiração (E); D-Razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) em folhas de *Handroanthus chrysotricus* e *Garcinia gardneriana* 72 horas após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam tratamentos numa mesma espécie. (n=5).

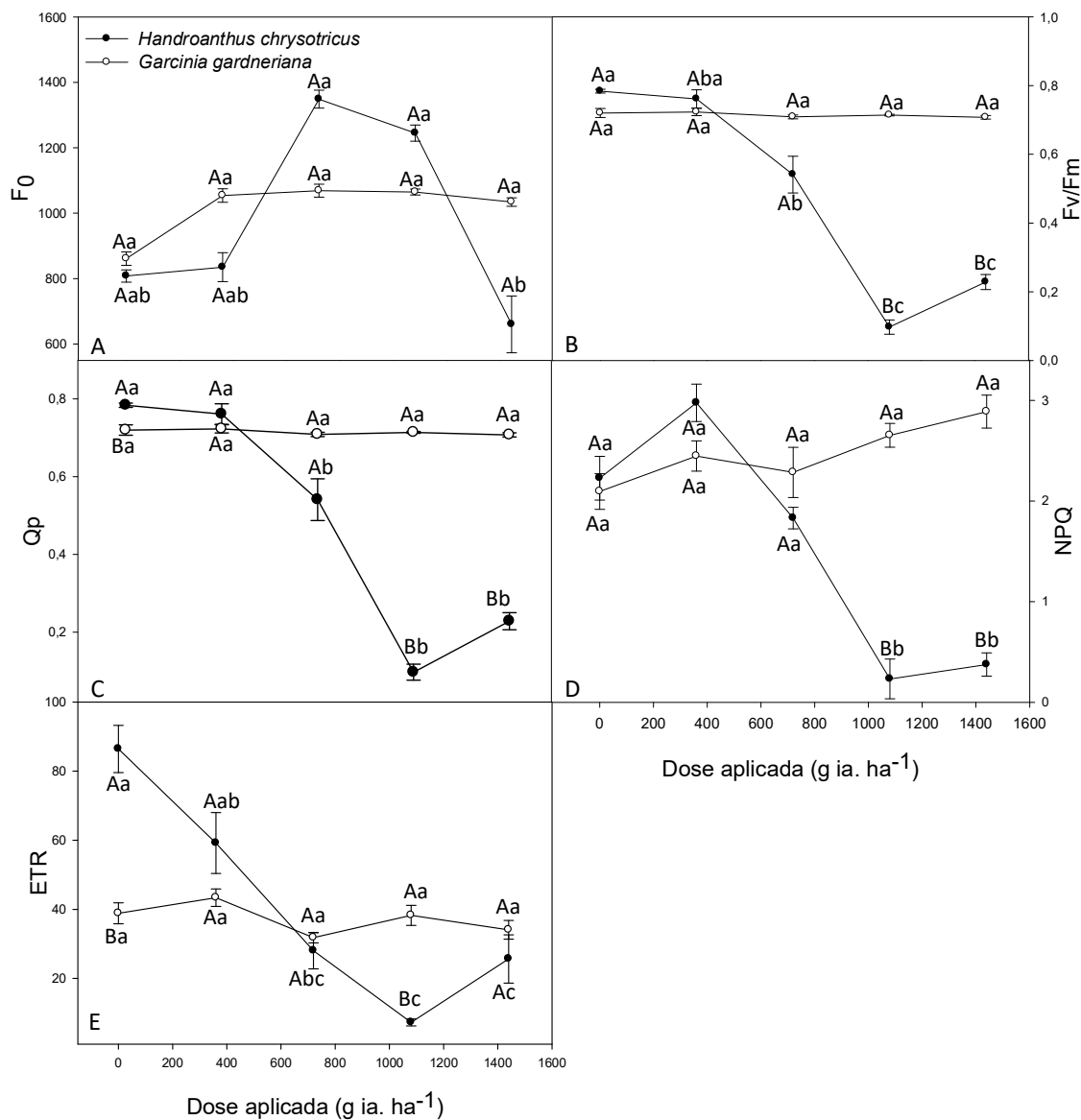


Figura 5- A- Fluorescência mínima (F₀), B- eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), C- *quenching* fotoquímico (Q_p) D- *quenching* não fotoquímico (NPQ) E- Taxa aparente de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR) em folhas de *Handroanthus chrysotricus* e *Garcinia gardneriana* 72 horas após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam tratamentos numa mesma espécie. (n=5).

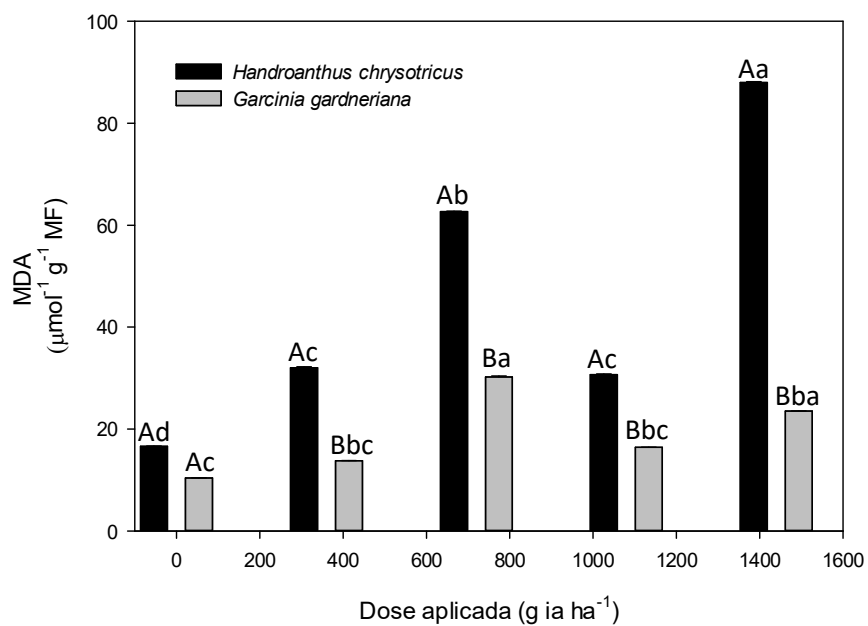


Figura 6- Peroxidação lipídica em folhas de *Handroanthus chrysotricus* e *Garcinia gardneriana* 72 horas após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam tratamentos numa mesma espécie. (n=5).

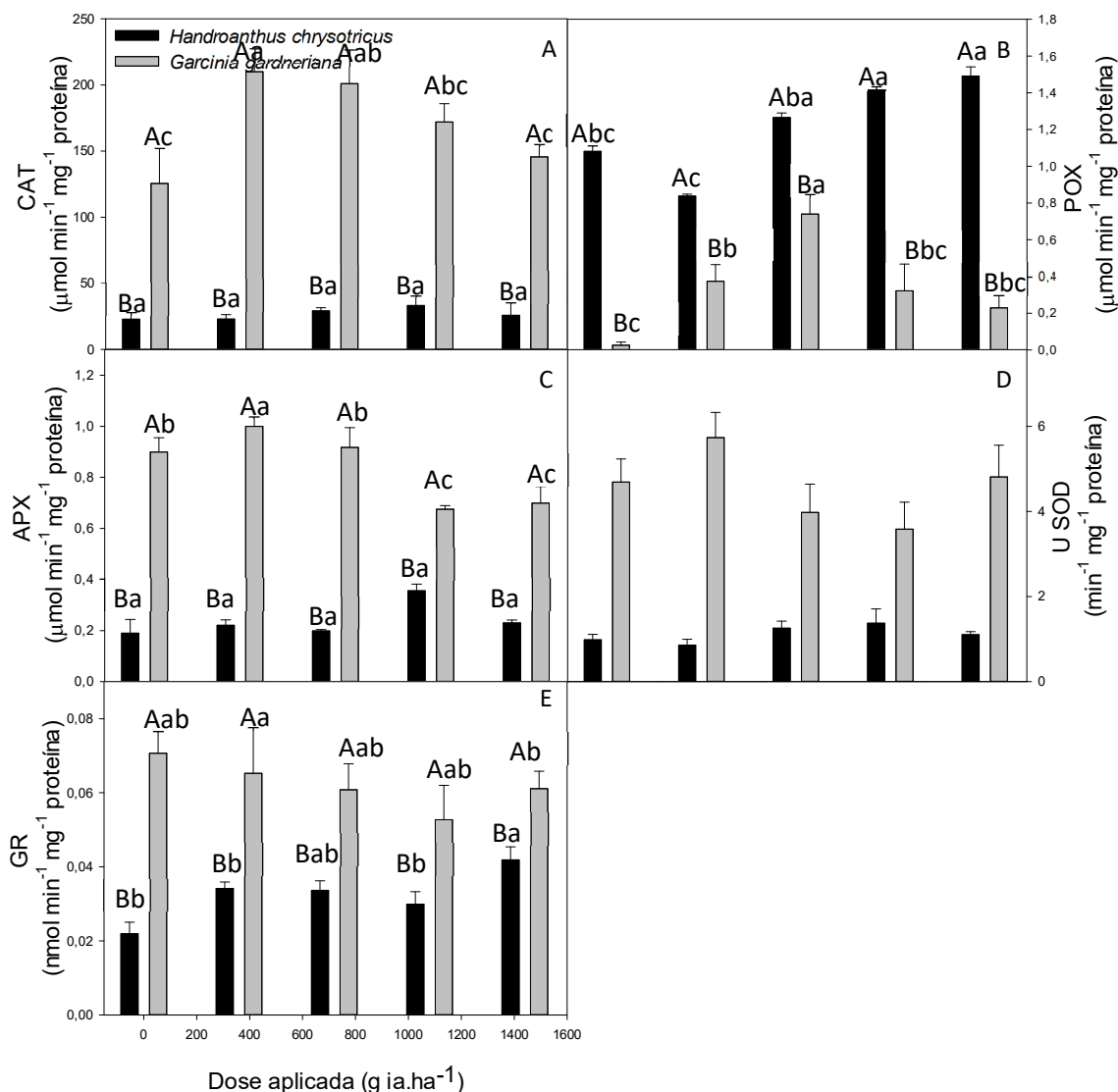


Figura 7- Atividade da Catalase (A); Peroxidases (B); APX (C); SOD (D) e GR (E) em folhas de *Handroanthus chrysotricus* e *Garcinia gardneriana* 72 horas após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam tratamentos numa mesma espécie. (n=5).

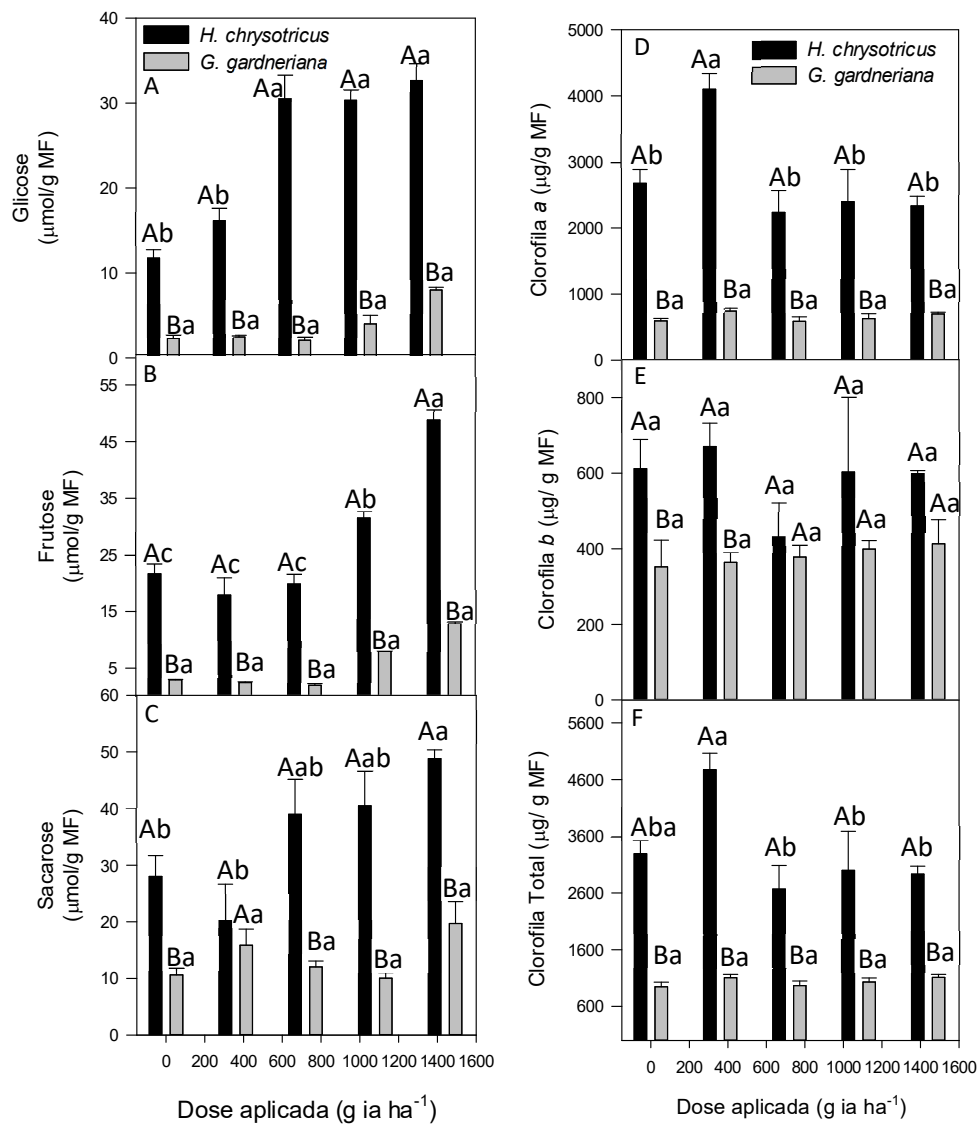


Figura 8- Teores de glicose, frutose, sacarose, clorofila *a*, *b* e total em folhas de *Handroanthus chrysotricus* e *Garcinia gardneriana* 72 horas após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam tratamentos numa mesma espécie. (n=5).

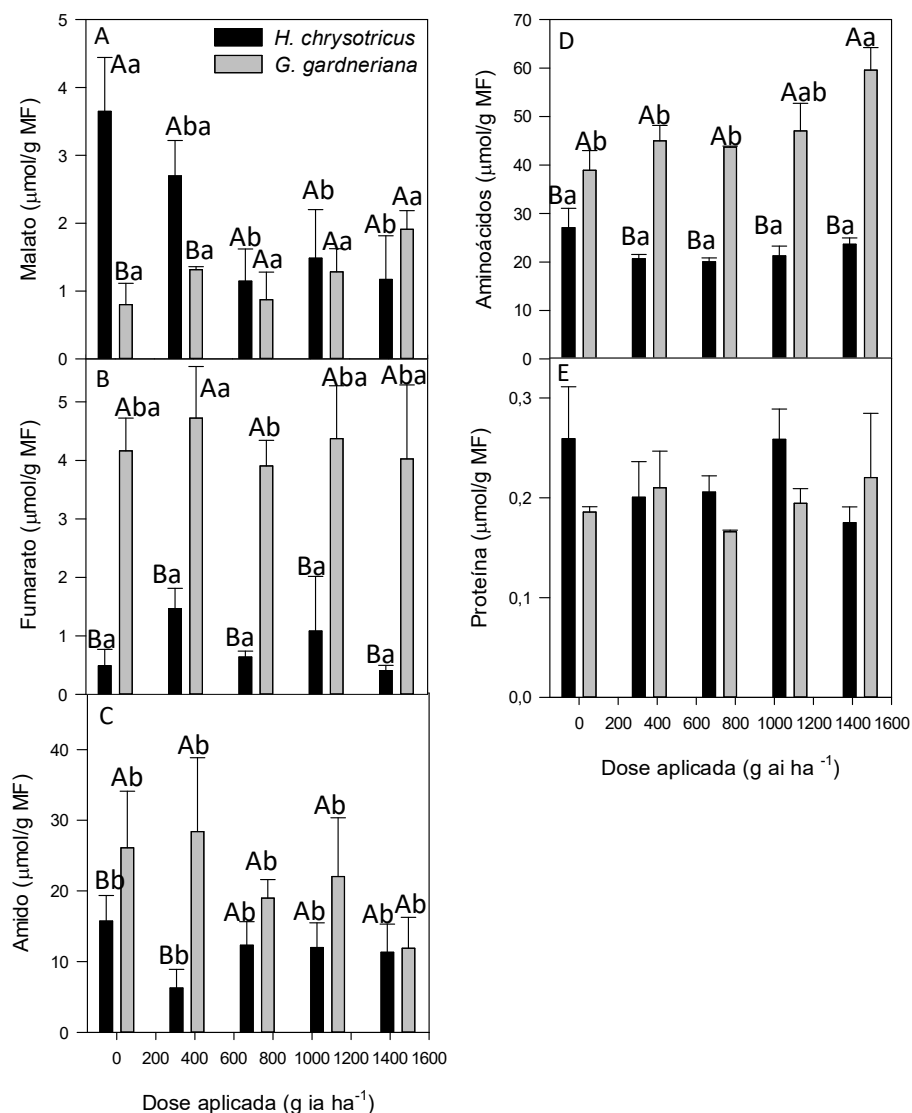


Figura 9- Teores de malato, fumarato, amido, aminoácidos e proteína em folhas de *Handroanthus chrysotricus* e *Garcinia gardneriana* 72 horas após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam espécies no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam tratamentos numa mesma espécie. (n=5).

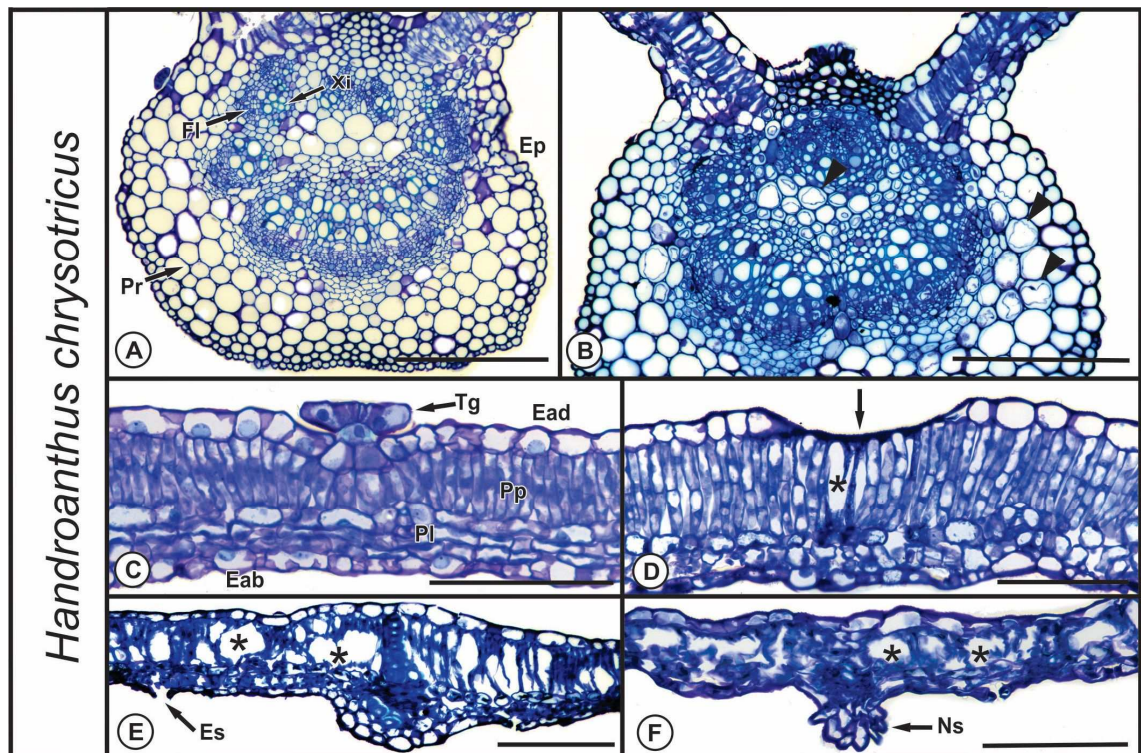


Figura 10- Alterações anatômicas nas folhas de *Handroanthus chrysotricus* 7 dias após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato. Cortes transversais observados em microscopia de luz. Controle (A, C); submetidas a 720 g ia ha⁻¹ (B, D); 1080 g ia ha⁻¹ (E) e 1440 g ia ha⁻¹ (F). Retração de protoplasto na nervura central (B); Necrose do limbo foliar e meato no parênquima paliçádico (D); colapso das células do mesofilo (E); Deformação de nervura de segunda ordem (F). Ep: epiderme; Xi: xilema; Fl: floema; Pr: parênquima; Tg: tricoma glandular; Ead: face adaxial da epiderme; Pp: parênquima paliçádico; Pl: parênquima lacunoso; Eab: face abaxial da epiderme; Es: estômato; Ns: nervura de segunda ordem. Cabeça de seta: indica retração do protoplasto; seta: necrose do limbo foliar; asterisco: rompimento das células do mesofilo.

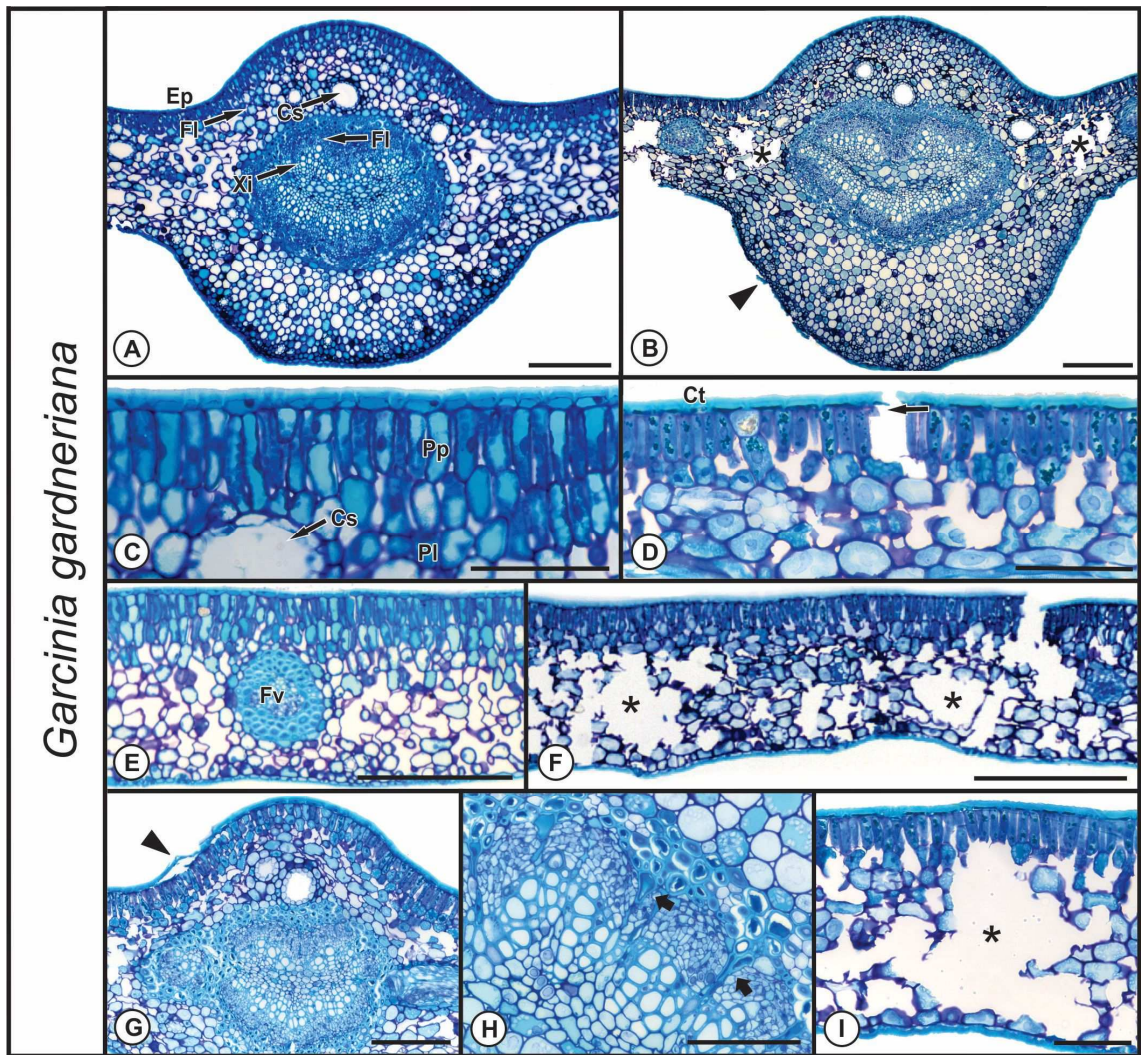


Figura 11- Alterações anatômicas nas folhas de *Garcinia gardneriana* 7 dias após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato. Cortes transversais observados em microscopia de luz. Controle (A, C e E); e submetidas a 1440 g ia ha⁻¹ (B, D, F, G, H e I). Rompimentos das células parenquimáticas na nervura principal e descamação da cutícula (B); Rompimento da cutícula e das células do mesofilo (D); Rompimento das células do mesofilo (F); Descamação da cutícula e rompimento das células da epiderme (G); Deformação dos elementos de vaso do xilema (H); Rompimento total do mesofilo (I). Ep: epiderme; Xi: xilema; Fl: floema; Cs: canal secretor; Pp: parênquima paliçádico; Pl: parênquima lacunoso; Ct: cutícula; Fv: feixe vascular. Asterisco indica rompimento das células do mesofilo; cabeça de seta indica descamação da cutícula; seta maior indica rompimento da cutícula; seta menor indica deformação do xilema.

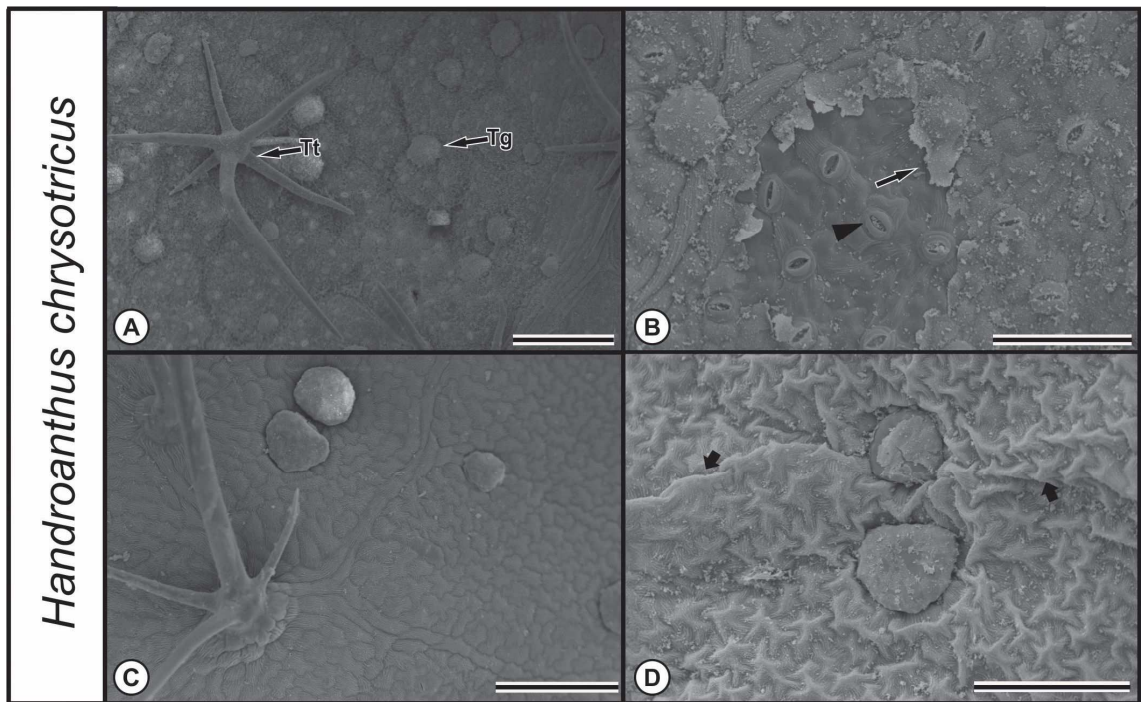


Figura 12- Alterações anatômicas nas folhas de *Handroanthus chrysotricus* 7 dias após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato, observados em Microscopia Eletrônica de Varredura. Controle superfície abaxial (A); superfície adaxial (C); e submetidas a 720 g ia ha⁻¹ (B e D). Descamação da cutícula e obliteração de estômato (B); aspecto plasmolizado da superfície das células epidérmicas (D). Tt: tricoma tector; Tg: tricoma glandular; seta fina indica descamação da cutícula; cabeça de seta indica obliteração de estômato; seta grossa indica enrugamento da superfície da epiderme.

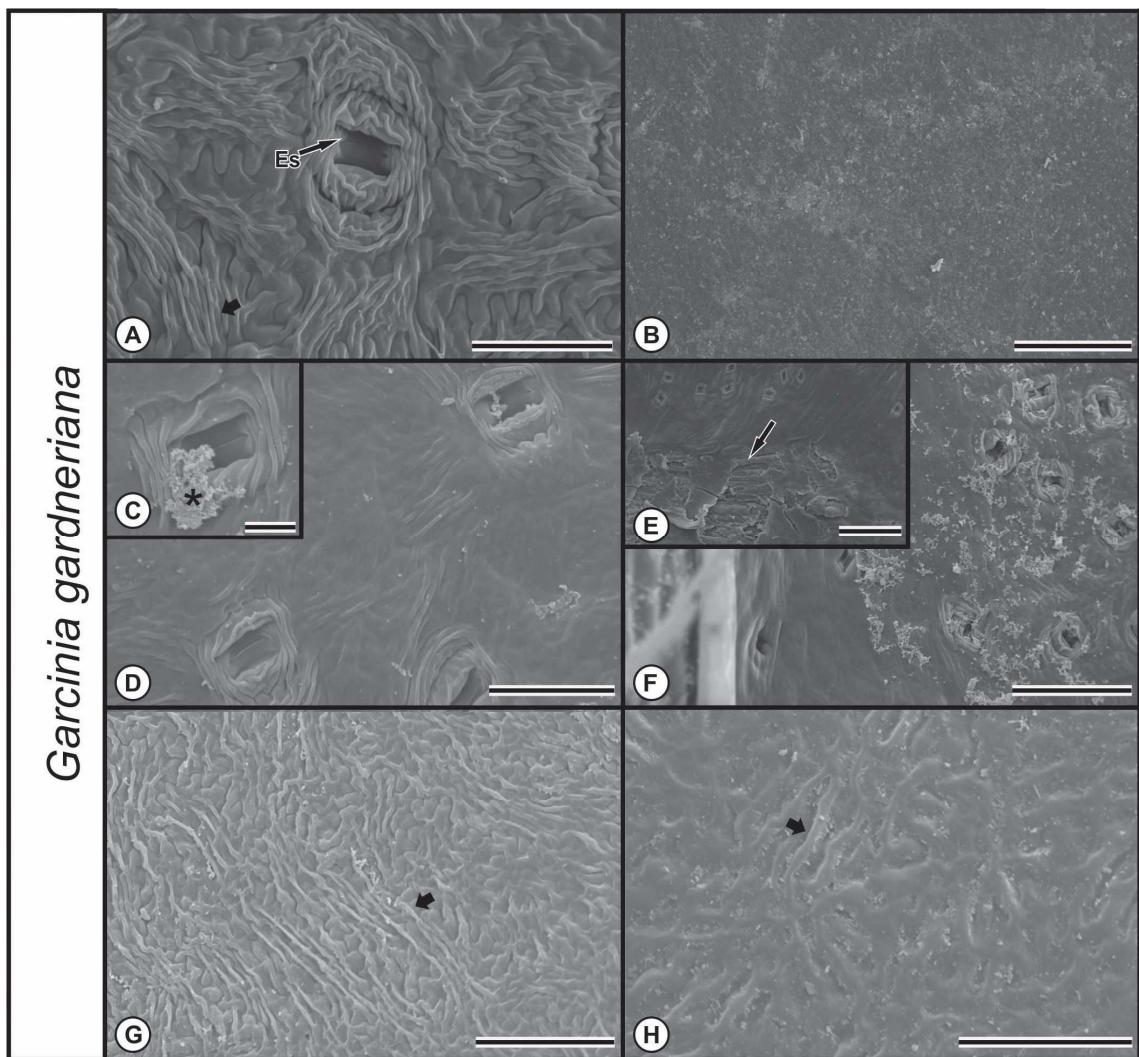


Figura 13- Alterações anatômicas nas folhas de *Garcinia gardneriana* 7 dias após a exposição a doses crescentes do herbicida glifosato, observados em Microscopia Eletrônica de Varredura. Controle superfície abaxial (A); controle superfície adaxial (B); e submetidas a 1440 g ia ha⁻¹ (C-H). Obliteração do estômato (C e D); Descamação da cutícula (E e F) aspecto plasmolizado da superfície das células epidérmicas (G e H). Seta grossa indica aspecto túrgido das células epidérmicas no controle e plasmolizado no tratamento; asterisco indica obliteração de estômato; seta fina indica descamação de cutícula.

Capítulo II

Mecanismos de defesa contra o estresse nitro-oxidativo induzido pelo glifosato em *Arabidopsis thaliana*

Resumo

Glifosato é um herbicida extensivamente usado em todo mundo. Nós objetivamos avaliar quais mecanismos de defesa são desenvolvidos em *Arabidopsis thaliana* crescendo em meio de cultura contendo 20 μ M de glifosato durante 14 dias. Nas plantas tratadas, houve detecção histoquímica do radical superóxido e de malondialdeído, além do aumento na peroxidação de proteínas, maior atividade das enzimas do sistema antioxidativo e aumento na produção de NO. Todos indicativos da ocorrência de estresse nitro-oxidativo. Um eficiente uso do ciclo ascorbato- glutationa e aumento na atividade das desidrogenases glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) sugere que estes sejam os mecanismos mais eficientes utilizados por esta espécie para a manutenção da homeostase durante o estresse provocado por glifosato. 6PGDH mostrou ser a enzima mais estável frente a diferentes agentes redutores e oxidantes, indicando que ela pode ser a desidrogenase chave para a produção de poder redutor celular neste estresse provocado em *Arabidopsis thaliana*.

Palavras-chave: glutationa, desidrogenases, enzimas antioxidantes, herbicida, estresse abiótico

Introdução

Glifosato [(N-fosfonometil) glicina] é um herbicida não seletivo, pós emergente, extensivamente utilizado em todo mundo por controlar o desenvolvimento de uma grande variedade de espécies daninhas (Sergiev et al., 2006; Ahsan et al., 2008). Ele atua inibindo a ação da 5-enolpyruvylshikimate-3 phosphate (EPSPS) synthase (EPSPS EC 2.5.1.19), uma enzima cloroplastídica atuante na rota do chiquimato (Preston e Wakelin, 2008; Lushchak et al., 2009). A inibição dessa enzima leva ao acúmulo de ácido chiquímico no citosol e conseqüentemente a inibição da biossíntese de aminoácidos aromáticos (Sergiev et al., 2006). Deficiência de aminoácidos aromáticos pode influenciar a síntese de proteínas, causar inibição de crescimento e levar a planta à morte (Ahsan et al., 2008; Rabelo et al., 2012).

A capacidade do oxigênio em receber elétrons livres favorece a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gil e Tuteja, 2010), as quais são extremamente danosas para a célula por reagir com lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucleicos

comprometendo a viabilidade celular (Navrot et al., 2007). O aumento na produção de ROS sob algum tipo de estresse biótico ou abiótico é bem documentada (Del Río et al., 2006; Palma et al., 2006; Navrot et al., 2007). Recentemente, aumento do óxido nítrico (NO) e agentes nitradores como peróxido nítrico (ONOO⁻) e dióxido de nitrogênio (NO₂) vem sendo descrito como resposta a estresse biótico e abiótico (Corpas et al., 2008; Souza et al., 2008).

Plantas podem gerar NO enzimaticamente através da via da L- arginina e nitrito, atividade dependente da óxido nítrico sintase (NOS) (Corpas et al., 2011); através da atividade da nitrato redutase (NR) (Yamasaki et al., 1999; Wilson et al., 2008). Não enzimaticamente, esse radical pode ainda ser formado pela redução do nitrito (Del-Río et al., 2004).

O NO em excesso pode interagir com moléculas como lipídeos e proteínas, sendo a S- nitrosilação, uma modificação pós traducional que ocorre nos resíduos de cisteína de algumas proteínas, a alteração mais estudada na atualidade e marcadora do estresse nitrosativo (RNS), denominação dada às modificações que ocorrem na célula em virtude deste estresse causado por NO e moléculas associadas (Corpas et al., 2007; Corpas et al., 2011; Leterrier et al., 2011). Ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) são capazes de gerar agentes nitradores, indicando que a produção de RNS e ROS envolve rotas interligadas e o aumento da produção de ROS pode favorecer a produção de RNS (Corpas e Barroso 2013).

O desequilíbrio no metabolismo de ROS vem acompanhado de alterações no aparato antioxidante da célula, incluindo aumento de diversas enzimas antioxidantes como SOD, CAT (Garg e Manchanda, 2009; Polidoros e Scandalios, 1999), aquelas envolvidas no ciclo ascorbato glutationa: APX, MDHAR, DHAR, GR (Palma et al., 2006) e também moléculas antioxidantes de baixo peso molecular como ascorbato, glutationa e carotenoides (Gil e Tuteja et al., 2010).

O NADPH é um doador de elétrons requerido para inúmeras atividades metabólicas como biossíntese de ácidos graxos e açúcares, para a produção de NO pela L- arginina Óxido Nítrico sintase (Corpas e Barroso, 2014; Leterrier et al., 2012a; Leterrier et al., 2012b). O equilíbrio entre NADP e NADPH é importante em situações de estresse porque essa também é a principal molécula doadora de elétrons para processos chaves do sistema antioxidante como por exemplo, o ciclo ascorbato-glutationa (Corpas e Barroso, 2014).

Ferridoxina NADP redutase, componente do fotossistema I é a principal enzima capaz de gerar poder redutor na forma de NADPH (Leterrier et al., 2012). As

Desidrogenases NADP dependentes: Glicose 6- fosfato desidrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49), 6- fosfogluconato desidrogenase (6PGDH, EC 1.1.1.44), ambas pertencentes a via das pentoses fosfatadas, NADP enzima málica (NADP-ME, EC 1.1.1.40) e NADP isocitrato desidrogenase (NADP-ICDH, EC 1.1.1.42), estão presentes em diversos componentes celulares e são as principais enzimas geradoras de poder redutor na fase bioquímica da fotossíntese (Corpas e Barroso, 2015). Sendo assim, as desidrogenases NADP dependentes vem sendo consideradas como importantes integrantes da segunda linha do sistema antioxidativo vegetal (Letettier et al., 2012).

Arabidopsis thaliana é uma Brassicacea referência para diversos trabalhos multidisciplinares, tendo em vista o amplo uso do herbicida glifosato e a inexistência de dados na literatura sobre as alterações que ocorrem no metabolismo antioxidativo de desta espécie quando exposta a ele, nosso estudo objetivou avaliar quais os ajustes são realizados na bioquímica da planta quando exposta a este estresse, tendo em vista a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a atividade das enzimas do sistema antioxidativo, das enzimas geradoras de poder redutor da fase bioquímica da fotossíntese e o comportamento de 6PGDH e G6PDH sobre ação de diferentes agentes redutores e oxidantes. Nós gostaríamos de testar as seguintes hipóteses: (i) o glifosato será capaz de provocar estresse nitro/oxidativo em *A. thaliana* (ii) as enzimas geradoras de poder redutor na fase bioquímica d terão fotossíntese comportamento diferenciado frente as alterações bioquímicas causadas por glifosato em *A. thaliana*.

Material e métodos

Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *Arabidopsis thaliana* var. Columbia foram esterilizadas superficialmente em etanol 70% contendo 0,1% de SDS durante 5 minutos. Em seguida, as sementes foram transferidas para água estéril contendo 20% de água sanitária e 0,1% de SDS e em seguida lavadas 4 vezes em água estéril durante 5 minutos cada vez. As sementes foram postas pra germinar em placa de petri estéril contendo 4,32 g/L de meio Murashige and Skoog, pH 5.5, contendo 1 % de sacarose e 0,8 % de fitoágar. Para determinar a dosagem de glifosato a ser utilizada, foi realizado um experimento piloto dose resposta, onde adicionamos no meio de cultivo 4 doses do herbicida: 0, 10, 20 e 40 μM e avaliamos sintomatologia visual e o crescimento. A dose selecionada para os demais experimentos foi 20 μM porque ocorreram alterações nos parâmetros acima mencionados em relação ao controle e não houve morte da planta. As placas de Petri

contendo as sementes foram incubadas a 22° C/18 °C (16 h luz/8 h escuro), sob intensidade luminosa de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 14 dias, tempo total de todos os experimentos. Todas as análises foram realizadas em plantas inteiras.

Parâmetros de crescimento

Para avaliar qual o efeito do glifosato no crescimento e germinação de *A. thaliana*, logo após a coleta, as plantas tiveram seu comprimento (cm), peso fresco (g) e taxa de germinação (%) aferidos.

Histolocalização de peroxidação lipídica e ânion superóxido

Para a detecção de radical superóxido (O_2^-), as plantas foram incubadas em NBT a 0,05 μM em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,8 durante uma hora no escuro e sob vácuo, em seguida clarificadas em etanol 70 % sob fervura até o aparecimento de pontos negros (Yamamoto et al., 2001), indicativo da produção de ânion superóxido.

A detecção histoquímica da peroxidação de lipídeos foi realizada com reagente de Schiff, o qual detecta aldeídos originados dos peróxidos lipídeos (Yamamoto et al., 2001). As plantas foram incubadas no reagente de Schiff por uma hora a temperatura ambiente, em seguida clarificadas em etanol 70 % sob fervura até o aparecimento de pontos rosa, indicativos da peroxidação lipídica.

Obtenção dos extratos brutos

Para as análises bioquímicas, *A. thaliana* foram coletadas da placa de Petri com auxílio de pinça e então maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofaris. O macerado foi suspenso em meio de extração contendo 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 0,1mM EDTA, 0,2% (v/v) Triton X-100, 5mM DTT e 10% (v/v) glicerol. O homogenizado foi centrifugado a 27.000 xg por 27 minutos e o sobrenadante utilizado para as análises.

Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

A concentração de H_2O_2 nos extratos de *A. thaliana* foi determinada espectrofotometricamente através da oxidação de 4-amininoantipirina catalisada por uma peroxidase (Frew et al., 1983). 500 μl do extrato bruto foi adicionado ao meio de reação contendo fenol a 25 mM, 4-aminoantipirina a 5 mM, tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,9, peroxidase a 0,02 μM e H_2O_2 a 2,5 μM . A absorvância foi mensurada a 505 nm, utilizando curva de peróxido de hidrogênio como padrão.

Determinação da oxidação de proteína

A oxidação de proteínas foi determinada através da reação dos grupos carbonila com 2,4- dinitrofenilhidracinas (DNPH) (Tien et al., 1991). Para tal, 200 µl do extrato bruto de *A. thaliana* foi incubado no escuro em 10 mM de DNPH. Em seguida, as amostras foram incubadas em ácido tricloroacético 20% por 15 minutos e em seguida o precipitado proteico foi suspenso em cloridrato de guanidina 6 M. A absorvância foi lida a 370 nm e os valores comparados com curva padrão de BSA preparada em guanidina.

Análises enzimáticas

Atividade da glicolato oxidase (GOX EC 1.1.3.1) foi determinada medindo a formação do glioxilato-fenilhidrazona (Kerr and Groves, 1975). Hidroxipiruvato redutase (HPR) foi determinada segundo o protocolo descrito por Schwitzguébel e Siegenthaler (1984).

A atividade da catalase (CAT EC 1.11.1.6) foi determinada através do consumo de H₂O₂, segundo Aebi (1984). Glutathione redutase (GR EC 1.6.4.2), foi determinada pela oxidação do NADPH, como descrito por Jiménez et al. (1997). APX (EC 1.11.1.11) foi determinada oxidação do ascorbato pelo H₂O₂ a 290 nm (Hossain & Asada, 1984). A atividade da monodesidroascorbato redutase (MDAR EC 1.6.5.4) foi medida avaliando a oxidação da monodesidroascorbato dependente de NADH com monodesidroascorbato sendo gerado pelo sistema ascorbato/ascorbato redutase (Hossain et al., 1984). O nível de monodesidroascorbato independente da oxidação do NADH (sem ascorbato e ascorbato redutase) foi subtraído da reação dependente de NADH. Desidroascorbato redutase (DHAR EC 1.8.5.1) foi determinada segundo a metodologia descrita por Dalton et al., (1993), mensurando a formação do ascorbato em 265 nm. A reação foi corrigida pela redução não enzimática do desidroascorbato pela glutathione (GSH), aplicando um fator de correção de 0,98.

Glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH EC 1.1.1.49), foi determinada pela redução do NADP a 340 nm. Os ensaios foram realizados a 25 °C em um meio de reação constituído de tampão HEPES 50 mM, pH 7.6, 2mM MgCl₂ e 0,8 mM NADP e a reação foi iniciada pela adição de 5 mM de glicose 6 fosfato. Para a determinação de 6 fosfogluconato desidrogenase (6PGDH; EC 1.1.1.44), o meio de reação foi igual ao descrito anteriormente para G6PDH mas o substrato iniciador da reação foi 5 mM de 6 fosfogluconato (Corpas et al., 1998). Atividade da NADP isocitrato desidrogenase

NADP-ICDH, EC 1.1.1.42) foi medida através da redução do NADP (Corpas et al., 1999). O ensaio foi realizado a 25 °C em um meio de reação contendo HEPES 50 mM, pH 7.6, 2 mM MgCl₂ e 0,8 mM NADP, a reação foi iniciada adicionando 10 mM 2R,3S-isocitrato. Enzima málica dependente de NADP (NADP-ME; EC1.1.1.40) foi determinada pela redução do NADP a 340 nm usado o mesmo meio de reação descrito para as demais desidrogenadas, entretanto a reação foi iniciada pela adição de L- Malato a 1 mM (Valderrama et al., 2006).

Determinação de isoformas de SOD, APX, 6PGDH e G6PDH em eletroforese não desnaturante (PAGE)

Os géis foram preparados com acrilamida 30%, diluída num meio contendo tampão Tris-HCl 4x 1,5M, pH 8,9; persulfato de amônio 7% e TEMED 1,5 µM.

Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos da mesma forma que foram obtidos para a determinação das atividades em espectrofotômetro. Isoenzimas de SOD (EC 1.15.1.1) foram separadas por eletroforese não desnaturante em gel de acrilamida preparado a 10% e visualizadas pela redução fotoquímica do NBT (nitroblue tetrazolium) (Beauchamp & Fridovich, 1971). Para identificar qual isoenzima, os géis foram incubados separadamente a 25 °C por 30–45 minutos em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 contendo 2 mM KCN (um gel) e 5 mM H₂O₂ (segundo gel). CuZn-SOD é inibida pelo CN e por H₂O₂. Fe-SOD é inibida por H₂O₂ mas não é inibida pelo CN, enquanto Mn- SOD não se inibe por nenhum dos dois (Corpas et al. 1998).

Isoenzimas de APX (EC 1.11.1.11) foram separadas por eletroforese não desnaturante em gel de acrilamida preparado a 8% e as bandas foram visualizadas pela redução fotoquímica do NBT (nitroblue tetrazolium) (Beauchamp e Fridovich, 1971). Isoenzimas de 6PGDH e G6PDH foram separadas em gel preparado a 8% e reveladas utilizando 50 mM de 6 fosfogluconato e 50 mM de glicose 6 fosfato, respectivamente. Ambos os substratos foram incubados separadamente em um meio de reação contendo tampão HEPES 50 mM pH 7,6 e NADP 0,8 mM (Corpas et al., 1998).

Determinação dos teores de ascorbato, glutatona e glutatona reduzida

Para a determinação dos teores de ascorbato, glutatona e glutatona reduzida, 20 mg da matéria fresca de *A. thaliana* foi extraída em HCl 2N, centrifugada por 25 min a 27000 xg e o sobrenadante derivatizado e utilizado para leitura em HPLC segundo protocolo estabelecido por Castillo e Greppin (1988) utilizando padrão interno como referência.

Determinação de distintos agentes oxidantes e redutores

Para determinar qual a influência de diferentes agentes oxidantes e redutores sobre a atividade de G6PDH e 6PGDH, 200 µl de amostras frescas foram incubadas em 5 mM de H₂O₂ e Deanoato como agente oxidante, 5 mM glutationa reduzida (GSH) como agente redutor, 5 mM S- nitrosoglutationa (GSNO) como doador de NO, 5 mM 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) o qual gera peroxinitrito e media os processos de nitração de tirosina (Chaki et al., 2009).

As amostras foram incubadas no escuro por duas horas a 25 °C. Em seguida, 50 µl das amostras foram utilizados para determinação da atividade de Glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH EC 1.1.1.49), pela redução do NADP a 340 nm. A reação foi iniciada pela adição de 5 mM de glicose 6 fosfato. Para a determinação de 6 fosfogluconato desidrogenase (6PGDH; EC 1.1.1.44), o substrato iniciador da reação foi 5 mM de 6 fosfogluconato e a absorvância foi lida a 340 nm (Corpas et al., 1998).

Detecção espectrofluorométrica de NO e ONOO-

Para a determinação de NO e ONOO- 50 µL do extrato bruto de *A. thaliana* foi adicionado a tampão HEPES KOH 50 mM pH 7,5. 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) e 3'p (aminofenil fluorescein) (APF) ambos na concentração final de 10 mM para a determinação de NO e ONOO-, respectivamente foram adicionados ao meio e então a reação foi incubada a 37 °C no escuro durante duas horas. A fluorescência foi medida em fluorímetro nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 512 nm para NO e 485 e 535 nm para ONOO- (Nakatsubo et al., 1998).

Outros ensaios

A concentração de proteína foi determinada com Bio-Rad Protein Assay (Hercules, CA), usando albumina bovina como padrão (Bradford 1976). Os dados estatísticos foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) usando o software SAEG- Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (Statistical and Genetic Analysis System) da Universidade Federal de Viçosa (Euclides, 2004) e as médias entre os tratamentos foram comparados pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados

Os resultados obtidos no primeiro experimento para delimitação da dose de tratamento a ser utilizada, revelaram que o glifosato afeta negativamente o crescimento radicular de *A. thaliana* a partir da dose de 10 µM (Figura 1 A). O peso fresco das

plantas reduziu significativamente a partir da dose de 20 μM (Figura 1 B), enquanto que a porcentagem de sementes germinadas não foi alterada pelo tratamento (Figura 1 C). Com 14 dias de exposição, o sintoma visual que as plantas apresentaram além da redução do crescimento foi murcha das folhas (Figura 1 D).

Já na dose estabelecida para as demais análises deste estudo, isto é: 20 μM ficou evidente a redução de crescimento (Figuras 2 A e B). glifosato provocou redução no peso fresco e no crescimento radicular das plantas (Figuras 2 C e D).

Para determinar se o herbicida aumenta a produção de agentes oxidantes, realizamos teste histoquímico para a localização de O_2^- . Raízes e folhas tiveram regiões intensamente marcadas com coloração negra, indicando que há a presença deste radical nesta espécie quando exposta ao herbicida (Figuras 3 C e D). A produção de malondialdeído também foi comprovada pelo aparecimento de regiões de coloração purpúrea nas folhas e raízes (Figuras 3 E e F), ambos os testes foram comparados com controle (Figuras 3 A e B).

A produção de H_2O_2 diminuiu nas plantas tratadas com glifosato (Figura 3 G). A oxidação de proteínas foi maior no tratamento quando comparado com o controle, indicando que o glifosato foi capaz de promover alteração neste parâmetro em *A. thaliana* (Figura 3 H).

Análise de enzimas chave da fotorrespiração revelou que o herbicida provoca aumento da atividade da glicolato oxidase (GOX) (Figura 4 A), enquanto que não houve alterações na atividade da hidroxipiruvato redutase (HPR) (Figura 4 B). O glifosato foi capaz de provocar alterações no sistema antioxidativo de *A. thaliana*. A atividade da catalase (CAT) aumentou nas plantas sobre condição de estresse (Figura 5 A), ascorbato peroxidase (APX) teve atividade 1,7 vezes maior no tratamento quando comparado com as plantas do controle (Figura 5 B). A análise da atividade SOD em gel nativa mostrou a presença de 3 isoenzimas (Figura 5 C), sendo que apenas a CuZn SOD teve sua atividade diminuída no tratamento, a atividade das outras isoenzimas não foi afetada pela ação do glifosato.

As atividades de desidroascorbato (DHAR) e monodesidroascorbato (MDHAR) foram aumentadas nas plantas submetidas ao herbicida (Figuras 6 A e B). A atividade de glutathiona redutase (GR) e de glutathiona reduzida (GSH) também tiveram seus valores aumentados nas plantas tratadas (Figuras 6 C e D), contraditoriamente, os valores de glutathiona oxidada (GSSG) e ascorbato não foram alterados pelo tratamento (Figuras 6 E e G). Ao passo que a razão GSH/GSSG também aumentou nas plantas tratadas (Figura 6 F).

A análise das principais desidrogenases NAD- dependentes também foi realizada neste trabalho. Enzima málica (ME) e Isocitrato desidrogenase (NADP- ICDH) não tiveram sua atividade influenciada pelo tratamento (Figuras 7 A e B). Glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6 fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) entretanto; tiveram os seus valores aumentados pelo tratamento (Figuras 7 C e D). Considerando que as duas últimas enzimas mostraram maior atividade frente ao tratamento, outras análises foram focadas nelas.

A análise da atividade G6PDH e 6PGDH em gel nativa mostrou a presença de 3 isoenzimas para ambas enzimas analisadas (Figura 7 E). A última isoforma da G6PDH apresentou uma menor atividade em ambos tratamentos quanto comparada com as demais isoformas desta enzima (Figura 7 E), enquanto que em 6PGDH, a primeira isoforma do tratamento apresentou um aumento de atividade quando comparada com a mesma isoforma do controle (Figura 7 E).

Para verificar a estabilidade das duas enzimas, realizamos um experimento com diferentes poderes redutores e oxidantes: Deanoato e H₂O₂ como agente oxidante, GSH como agente redutor, GSNO como doador de NO, SIN-1 o qual gera peroxinitrito e media os processos de nitração de tirosina. Deanoato, GSNO e GSH diminuíram a atividade de G6PDH (Figura 8 A), enquanto que nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar a função de 6PGDH (Figura 8 B), sugerindo que esta seja a enzima mais estável analisada neste experimento. A eletroforese nativa corroborou com os resultados bioquímicos, em G6PDH, houve diminuição nas bandas das três isoformas para os tratamentos com Deanoato, GSNO e GSH (Figura 8 C), enquanto que não foi observada diferença qualitativa entre controle e os tratamentos com 6PGDH (Figura 8 D). A produção de óxido nítrico (NO) aumentou nas plantas tratadas, indicando que o glifosato promove aumento na produção deste radical em *A. thaliana* (Figura 9 A), ao passo que glifosato não foi capaz de alterar a produção de peroxinitrito (ONOO-) nas plantas (Figura 9 B).

Discussão

Os efeitos que o glifosato provoca nas plantas, sua toxicidade e tolerância vêm sendo estudados em diferentes espécies vegetais principalmente em relação a 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase (EPSPS), principal enzima inibida pela ação do herbicida (Basantani et al., 2011). Entretanto, estudos que abordam as modulações que ocorrem no sistema antioxidante vegetal para os processos de detoxificação deste

herbicida ainda não são bem elucidados, tão pouco em uma espécie modelo como *A. thaliana*.

Houve redução de peso fresco e de crescimento radicular das plantas tratadas com o herbicida. A principal ação do glifosato é inibir a biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais por provocar alterações na rota do ácido chiquímico e perturbações no metabolismo do carbono (Orcaray et al., 2012). Nas plantas tratadas, houve aumento da atividade de glioxilato oxidase, enzima envolvida na fotorrespiração, o que implica numa menor incorporação de carbono sendo a redução de biomassa e crescimento uma das principais consequências descritas pela ativação da rota das pentoses fosfatadas. Já foi reportado na literatura que glifosato é capaz de provocar alterações no crescimento, como redução de peso fresco, seco e no comprimento radicular em outras espécies tratadas com diferentes doses deste herbicida (Baig et al., 2003; Basantani et al., 2011).

Histoquimicamente, foi documentado em nosso trabalho que o tratamento com glifosato aumentou a produção de O_2^- e bioquimicamente houve diminuição de H_2O_2 . Diversos fatores bióticos e abióticos levam a um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, promovendo a produção de ROS, as quais em excesso podem induzir estresse oxidativo na célula (Mittler, 2002; Gil e Tuteja, 2010). Ativação da rota da glicolato oxidase nos peroxissomos pela fotorrespiração, ocorrida nesse trabalho, pode ter favorecido o aumento a produção de ROS. Além disso, o glifosato causa danos indiretos na fotossíntese por interferir na fluorescência, na condutância ou na produção de pigmentos fotossintetizantes (Olesen e Cedergreen, 2010), elétrons livres por falhas neste sistema, podem promover a produção de ROS.

Houve aumento da peroxidação lipídica nas plantas tratadas com o herbicida, evidenciado histoquimicamente, além do aumento nos níveis de oxidação de proteínas. ROS em excesso interfere na bioquímica celular, provocando danos e comprometendo a viabilidade de componentes celulares como membrana plasmática, DNA e proteínas (Boscolo et al., 2003). Outros autores já descreveram a produção destes compostos frente a diferentes estresses (Sinha e Saxena 2006; Ahsan et al., 2008), sendo estes uns dos marcadores de estresse celular descrito na literatura (Gil e Tuteja, 2010).

Durante o período de exposição das plantas ao herbicida, houve indução do sistema antioxidante enzimático com aumento da atividade de SOD, CAT, APX, daquelas envolvidas no ciclo ascorbato glutationa: MDHA, DHAR, GR, além do aumento nos níveis de GSH, principal tiol não proteico em plantas (Szalalai et al., 2009).

Várias alternativas enzimáticas e não enzimáticas são ativadas com intuito de diminuir a produção de ROS e restabelecer a homeostase celular (Palma et al., 2006), de forma que o balanço entre SOD, CAT e APX é crucial para determinar o nível de H_2O_2 e O_2^- na célula (Bowler et al., 1991). SOD é considerada a primeira enzima do sistema antioxidativo por dismutar O_2^- . Houve a expressão de três isoformas de SOD: Mn-SOD, Fe-SOD, CuZn-SOD tanto nas plantas tratadas quanto no controle. O tratamento não induziu a expressão de novas isoformas, mas promoveu a supressão da isoforma CuZn/SOD nas plantas, o que diminuiu a atividade total da enzima, impossibilitando a manutenção de níveis homeostáticos de O_2^- nas plantas tratadas, uma vez que foi detectado histoquimicamente O_2^- nos tecidos das plantas tratadas e danos celulares evidenciados pela peroxidação lipídica.

Houve aumento da atividade de CAT e APX, duas enzimas envolvidas na eliminação de H_2O_2 nas plantas tratadas e concomitante diminuição do teor de H_2O_2 . A afinidade da APX pelo H_2O_2 é menor quando comparado com CAT (Mittler, 2002), sendo a CAT a enzima responsável pela remoção de grande parte desta molécula (Guo et al., 2014), tendo em vista que essa enzima ocorre espacialmente apenas em peroxissomos (Mittler et al., 2002), fica evidente a participação dessa organela nos processos de detoxificação.

GSH é um dos principais antioxidantes solúvel e de baixo peso molecular e o principal tiol não proteico nas plantas (Szalalai et al., 2009), contribuindo por manter a homeostase redox celular. Assim, a GSH exerce um papel protetor, tendo em vista a sua capacidade redutora. Uma maior relação entre GSH/GSSH, indica uma condição redox adequada na célula (Mittler et al., 2002). Maiores valores de GSH e uma maior relação de GSH/GSSG foram encontrados nas plantas tratadas, o que nos leva a sugerir que este pode ser um mecanismo eficiente de detoxificação desenvolvido por *A. thaliana* quando exposta ao glifosato.

Ascorbato e glutatona formam o ciclo ascorbato-glutationa, responsável por realizar uma série de reações redox, principalmente em tecidos fotossintetizantes (Foyer e Halliwell, 1976). Localizam-se principalmente em cloroplasto, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (Mittova et al., 2002), o qual se mostrou eficiente para a atenuação do estresse estudado neste trabalho. A manutenção de níveis de ascorbato e glutatona reduzidos é essencial para a eliminação de ROS e é mantido por GR, MDAR e DHAR, usando NADPH como poder redutor (Gil e Tuteja, 2010; Miller; 2010).

Por ser a via das pentoses fosfatadas a principal fonte de NADPH para a remoção de ROS (Pandolfi et al., 1995), muitos autores consideram as desidrogenases

geradoras de poder redutor como enzimas de segunda linha contra o estresse oxidativo (Leterrier et al., 2012). Entre as desidrogenases, 6PGDH e G6PDH merecem atenção especial por terem apresentado maior atividade, sugerindo que estas duas enzimas são as principais geradoras de NADPH e portanto; essenciais para a manutenção do estado redox celular e do ciclo ascorbato- glutationa. Entretanto, a eletroforese realizada com essas as duas enzimas sob ação de diferentes poderes redutores e oxidantes revelou que 6PGDH não é influenciada por nenhum deles, sendo portanto; mais estável que G6PDH e devido a isso é possível que 6PGDH seja crucial para a atenuação do estresse oxidativo gerado em *A. thaliana* pelo herbicida glifosato.

Embora seja um sinalizador celular com funções como crescimento da planta, germinação, amadurecimento de frutos e florescimento (Zafra et al., 2010), o NO e moléculas associadas começaram a ser investigados como causadores RNS em vegetais (Corpas et al., 2011). Houve aumento da produção de NO nas plantas tratadas, ao passo que os valores de ONOO- não se alteraram. As implicações direta ou indireta do NO nos mecanismos de respostas a estresses vem sendo estudadas com salinidade (Zhang et al., 2006); seca (Garcia-Mata e Lamattina, 2001) e altas temperaturas (Kotak et al., 2007).

Conclusão

Glifosato promoveu a produção de ROS em *A. thaliana*, evidenciada pela detecção de O_2^- , o que produz estresse oxidativo nas células, aumentando oxidação de proteínas e a produção de malondialdeído. Embora tenha ocorrido redução de crescimento, *A. thaliana* foi capaz de controlar o estresse, aumentando a atividade das enzimas do sistema antioxidativo e promovendo um eficiente uso ciclo ascorbato- glutationa. Aumento da atividade nas desidrogenases 6PGDH e G6PDH evidencia participação destas na manutenção do poder redutor celular, podendo ser duas enzimas essenciais para a manutenção da homeostase celular em *A. thaliana* quando tratada com o glifosato, principalmente 6PGDH por ter se mostrado a enzima mais estável quando comparada com G6PDH.

Referências Bibliográficas

- Aebi H (1984) Catalase *in vitro* Methods in Enzymology 105 121–126
- Ahsan N, Lee DG, Lee KW, Alam I, Lee SG, Bahk JD, Lee BH (2008) Glyphosate induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. Plant Physiology and Biochemistry 46: 1062–1070
- Baig MN, Darwent AL, Harker KN, O'Donovan JT (2003) Pre harvest applications of Glyphosate affect emergence and seedling growth of field pea (*Pisum sativum*). Weed Technol 17: 655–665
- Basantani M, Srivastava A, Sen S (2011) Elevated antioxidant response and induction of tau class glutathione S-transferase after Glyphosate treatment in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Pesticide Biochemistry and Physiology 99:111–117
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287
- Boscolo PRS; Menossi M, Jorge RA (2003) Aluminium- induced oxidative stress in maize. Phytochemistry 62:181-189
- Bowler, C (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. Embryo Journal 10: 1723–1732
- Bradford MM, (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254
- Castillo FJ, Greppin H (1988) Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. Environmental and Experimental Botany 28: 231–238
- Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM, Carreras A, López-Jaramillo J, Luque F, Palma JM, Pedrajas JR, Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Gómez- Rodríguez MV, Corpas FJ, Barroso JB (2009) Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. J. exp. Bot. 60: 4221-4234
- Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM (1998) A dehydrogenase- mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. Biochemical Journal 330(2) 777–784
- Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Palma JM, Lupianez JA, Del Río LA (1999) Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Characterization and activity regulation during natural senescence. Plant Physiology 121(3) 921–928
- Corpas FJ; Carreras A, Valderrama R; Chaki M; Palma JM; del Río LA; Barroso JB (2007) Reactive Nitrogen species and nitrosative stress in plants. Plant Stress 1:37-41
- Corpas JF, Chaki M, Fernández-Ocaña A, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, Del- Río LA, Barroso JB (2008) Metabolism of reactive

- nitrogen species in Pea Plants under abiotic stress condition. *Plant Cell Physiol* 49 (11) 1711-1722
- Corpas JF, Leterrier M, Valderrama R (2011) Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* 181(5): 604–611
- Corpas FJ; Palma JM; del Río LA; Barroso JB (2013) Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions *Frontiers in plant science* 4:1-4
- Corpas FJ e Barroso JB (2014) NADPH generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro oxidative stress induced by adverse environmental conditions. *Frontiers in environmental science* 2:1-5
- Dalton DA, Baird LM, Langeberg L, Taugher CY, Anyan WR, Vance CP, Sarath G (1993) Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules. *Plant Physiology* 102: 481–489
- Del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants, *Phytochemistry* 65: 783–792
- Del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* 141: 330-335
- Euclides, RF (2004) System for Statistical (SAEG 9.0). Fundação Arthur Bernardes-UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil
- Foyer, CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25
- Frew JE, Jones P, Scholes G (1983) Spectrofotometric determination of hydrogen peroxide and organic hidroperoxides at low concentrations in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta* 155:135-150
- García-Mata C, Lamattina L (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress, *Plant Physiology* 126: 1196–1204
- Garg N, Manchanda G (2009) ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems* 143(1) 81-96
- Gill, SS, Tuteja, N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12):909-930
- Guo DY; Zhao SY; Huang LL; Ma CY; Hao L (2014) Aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana* as affected by endogenous salicylic acid. *Biologia Plantarum* 58:729-732
- Hossain MA, Asada K (1984) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant & Cell Physiology* 25: 1285–1295

- Hossain MA, Nakano Y, Asada K (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplast and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging of hydrogen peroxide. *Plant & Cell Physiology* 25: 385–395
- Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* 114: 275–284
- Kerr MW, Groves D (1975) Purification and properties of glycollate oxidase from *Pisum sativum* leaves. *Phytochemistry* 14(2) 359-362
- Kotak J, Larkindale U, Lee P, von Koskull-Doring E, Vierling KD, Scharf L (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 310–316
- Leterrier M, Barroso JB, Valderrama R, Palma JM, Corpas FJ (2011) NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase from *Arabidopsis* Roots Contributes in the Mechanism of Defence against the Nitro-Oxidative Stress Induced by Salinity. *The Scientific World Journal* 2012: 1-9
- Leterrier M, Barroso JB, Palma JM, Corpas FJ (2012a) Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase in *Arabidopsis* leaves and roots. *Biologia Plantarum* 56(4): 705-710
- Leterrier M, Barroso JB, Valderrama R, Palma JM, Corpas FJ (2012b) NADP Dependent Isocitrate Dehydrogenase from *Arabidopsis* Roots Contributes in the Mechanism of Defence against the Nitro-Oxidative Stress Induced by Salinity. *The Scientific World Journal* 265: 1-9
- Tien M, Berlett BS, Levine RL, Chock PB, Stadtman ER (1999) peroxynitrite mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proceedings of the national Academy of Science USA* 96:7809-7814
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* 33 (4) 453–467
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum* 115 (3) 393–400.
- Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Letters* 427: 263–266
- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jaquot JB (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant* 129: 185-195

Olesen CF, Cedergreen N (2010) Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Pest Manag Sci* 66:536–542

Orcaray L, Zulet A, Zabalza A, Royuela M (2012) Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide Glyphosate. *Journal of Plant Physiology* 169:27–33

Palma JM, Jiménez A, Sandalio LM, Corpas FJ, Lundqvist M, Gómez M, Sevilla F, Del Río L (2006) Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants

Pandolfi PP (1995) Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *Embio Journal* 14: 5209–5215

Polidoros NA, Scandalios JG (1999) Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol Plant* 106: 112-120

Preston C, Wakelin A (2008) Resistance to Glyphosate from altered herbicide translocation patterns. *Pest Management Science* 64:372-376

Schwitzguébel JP, Siegenthaler PA (1984) Purification of peroxisomes and mitochondria from spinach leaf by percoll gradient centrifugation. *Plant Physiology* 75 670–674

Sergieiev IG; Alexieva VS, Ivanov SV, Moskova II, Karanov EN (2006) The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against Glyphosate action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85: 139–146

Sinha S, Saxena R (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside—a content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62:1340–1350

Souza, JM., Peluffo, G., and Radi, R. (2008) Protein tyrosine nitration –functional alteration or just a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* 45: 357–366

Valderrama R, Corpas JF, Carreras A (2006) The dehydrogenase- mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants *Plant, Cell and Environment* 29: 1449–1459

Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT (20008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants, *Plant Cell and Environment* 31: 622–631

Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme, *Trends in Plant Science* 4: 128–129

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in Pea roots. *Plant Physiology* 125(1): 199-208

Zafra A, Rodríguez-García MI, Alché JD (2010) Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biology* 10: 1-12

Zhang YY, Wang LL, Liu YL, Zhang Q, Wei QP, Zhang WH (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta* 224: 545–555

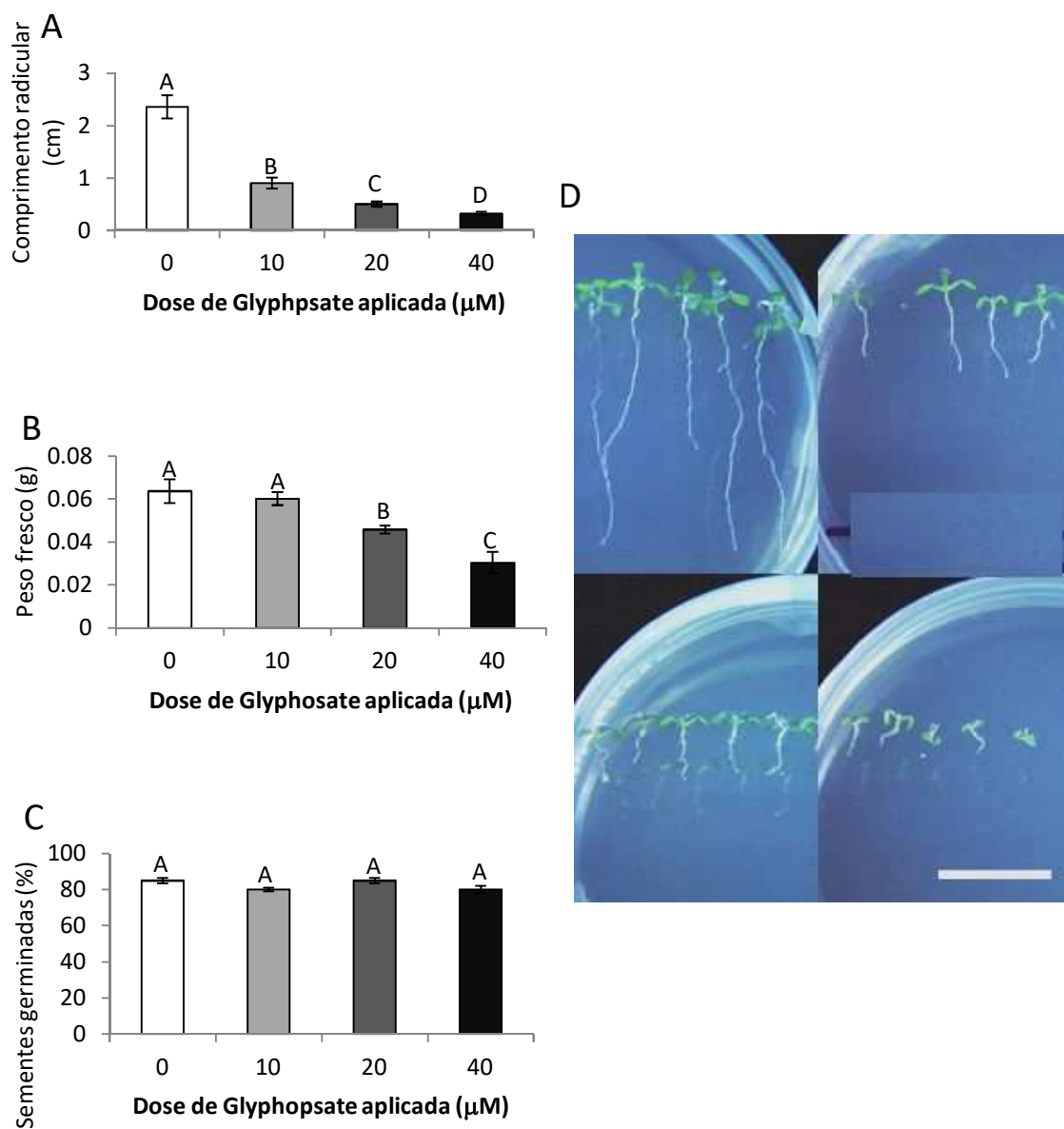


Figura 1: Efeito do herbicida glifosato em *Arabidopsis thaliana*. A: Comprimento radicular; B: Peso fresco; C: número de sementes germinadas e D: aspecto visual das plantas tratadas com 0, 10, 20 e 40 μM do herbicida por 14 dias. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Os resultados são médias de três experimentos diferentes. * indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra: 4 cm.

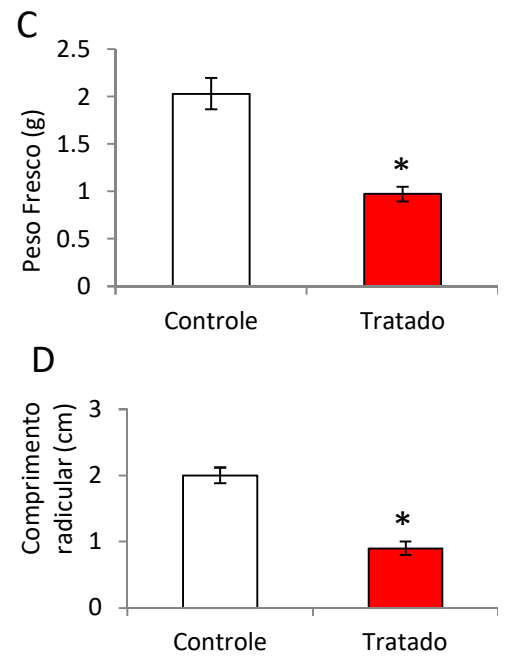
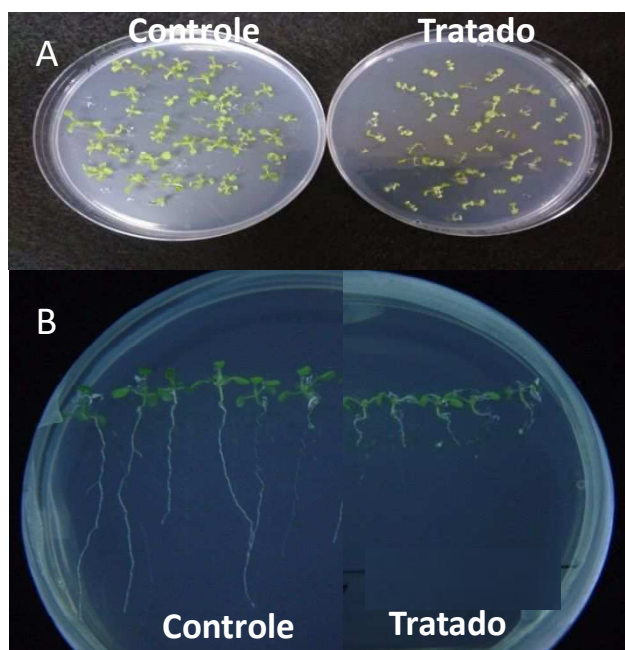


Figura 2: Efeito do glifosato no peso fresco (A e C) e no crescimento radicular (B e D) em *Arabidopsis thaliana*. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Os resultados são médias de três experimentos diferentes. * indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

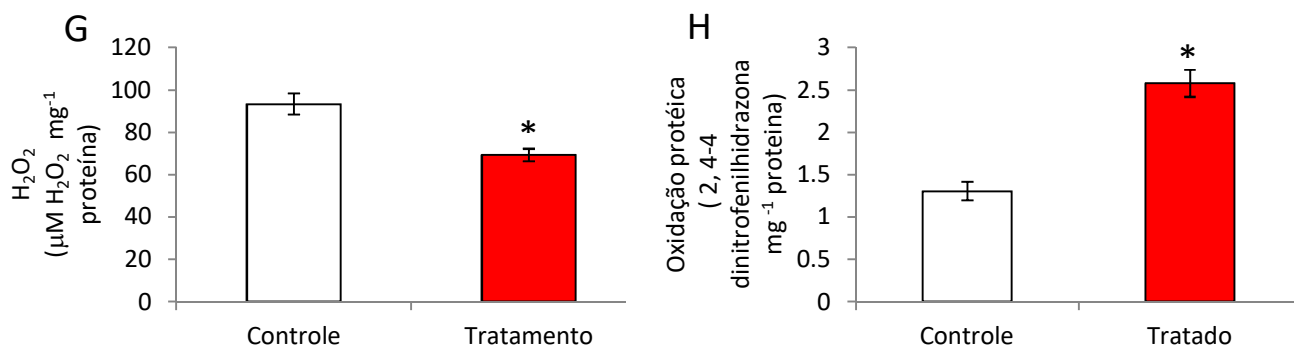
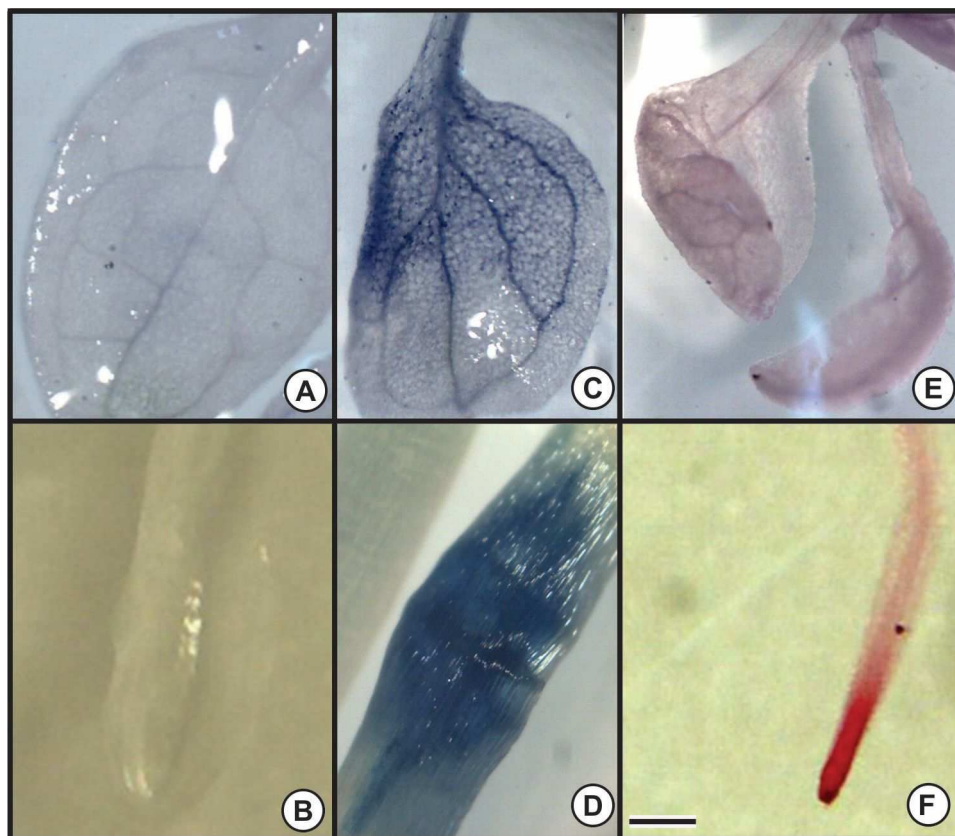


Figura 3: Controle (A e B); detecção de ânion superóxido (C e D) e peroxidação lipídica (E e F); quantificação bioquímica de H₂O₂ (G) e quantificação da oxidação de proteínas (H) em *Arabidopsis thaliana* tratada com o herbicida glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Os resultados são médias de três experimentos diferentes. * indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra: 5 cm.

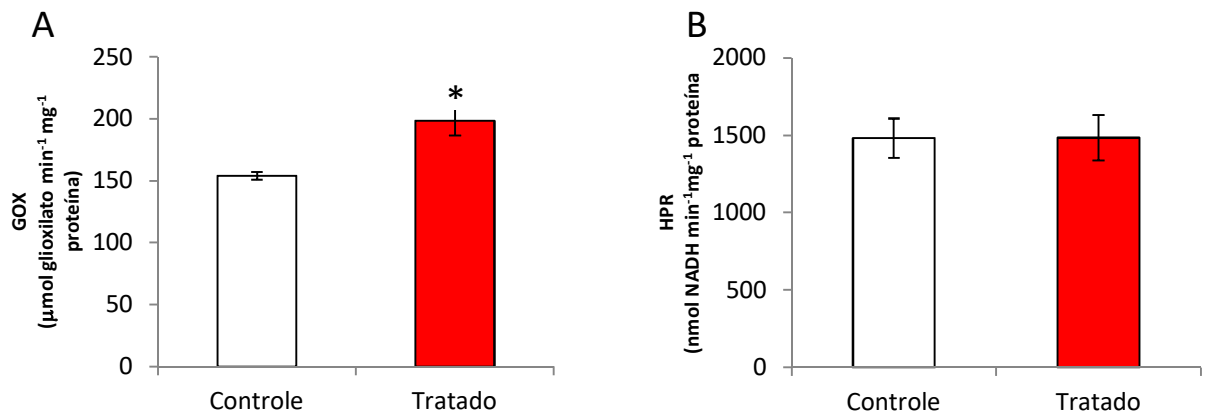


Figura 4: Atividade enzimática em *Arabidopsis thaliana* exposta ao herbicida glifosato. A: Glicolato oxidase (GOX) e B: Hidroxipiruvato redutase (HPR). Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Os resultados são médias de três experimentos diferentes. * indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

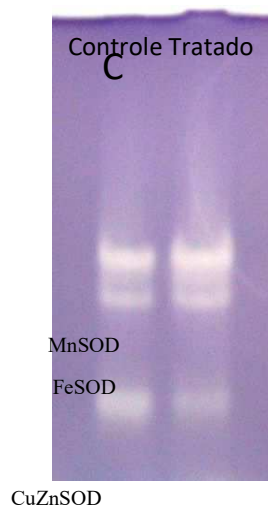
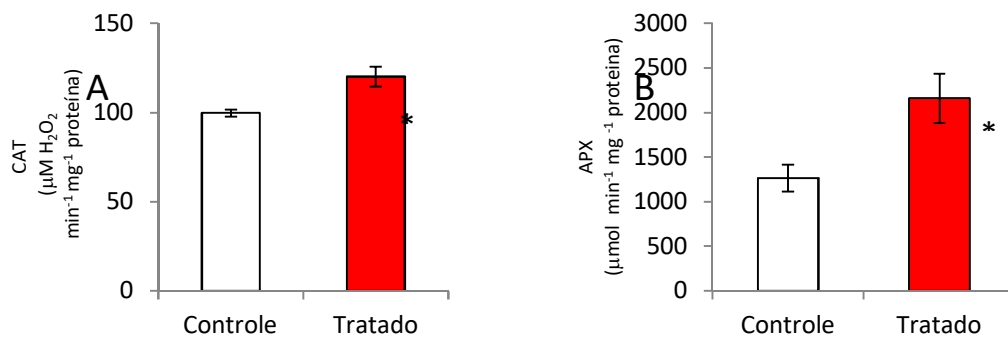


Figura 5: Atividade enzimática em *Arabidopsis thaliana* exposta ao herbicida glifosato. A: catalase (CAT), B: Ascorbato peroxidase (APX) e C: Atividade de SOD em gel de poliacrilamida. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Os resultados são médias de três experimentos diferentes. * indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

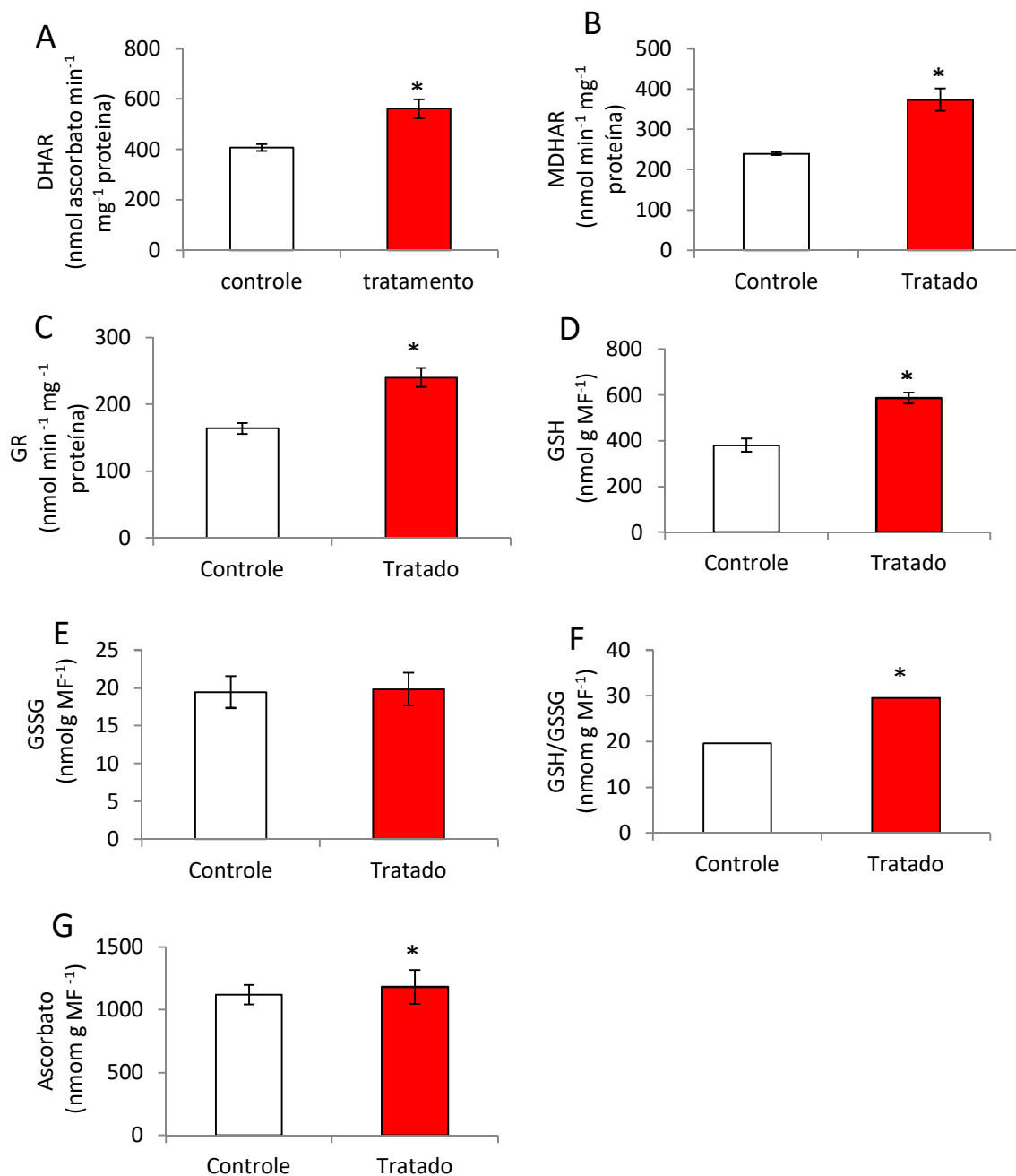


Figura 6: Atividade enzimática em *Arabidopsis thaliana* exposta ao herbicida glifosato A: Desidroascorbato redutase (DHA), B: Monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e C: Glutaciona redutase (GR). D: teores de glutaciona reduzida (GSH), E: Glutaciona oxidada (GSSH) F: razão GSH/GSSG e G: Ascorbato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Os resultados são médias de três experimentos diferentes. * indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

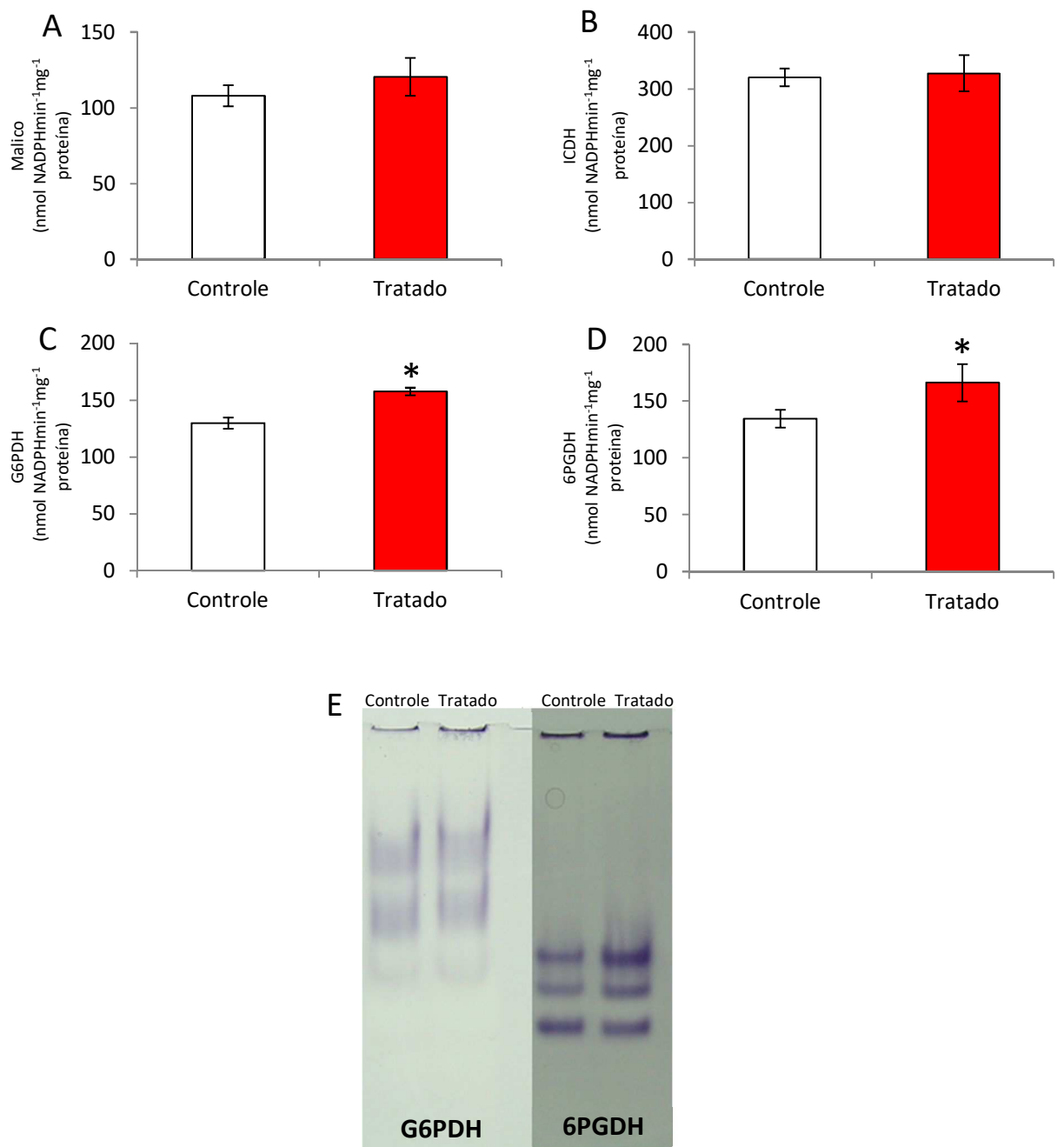


Figura 7: Atividade enzimática em *Arabidopsis thaliana* exposta ao herbicida glifosato. A: enzima málica (ME), B: Isocitrato desidrogenase (ICDH), C: Glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) e D: 6 fosfogluconato desidrogenase (6PGDH). E: atividade em gel de G6PDH e 6PGDH. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Os resultados são médias de três experimentos diferentes * indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

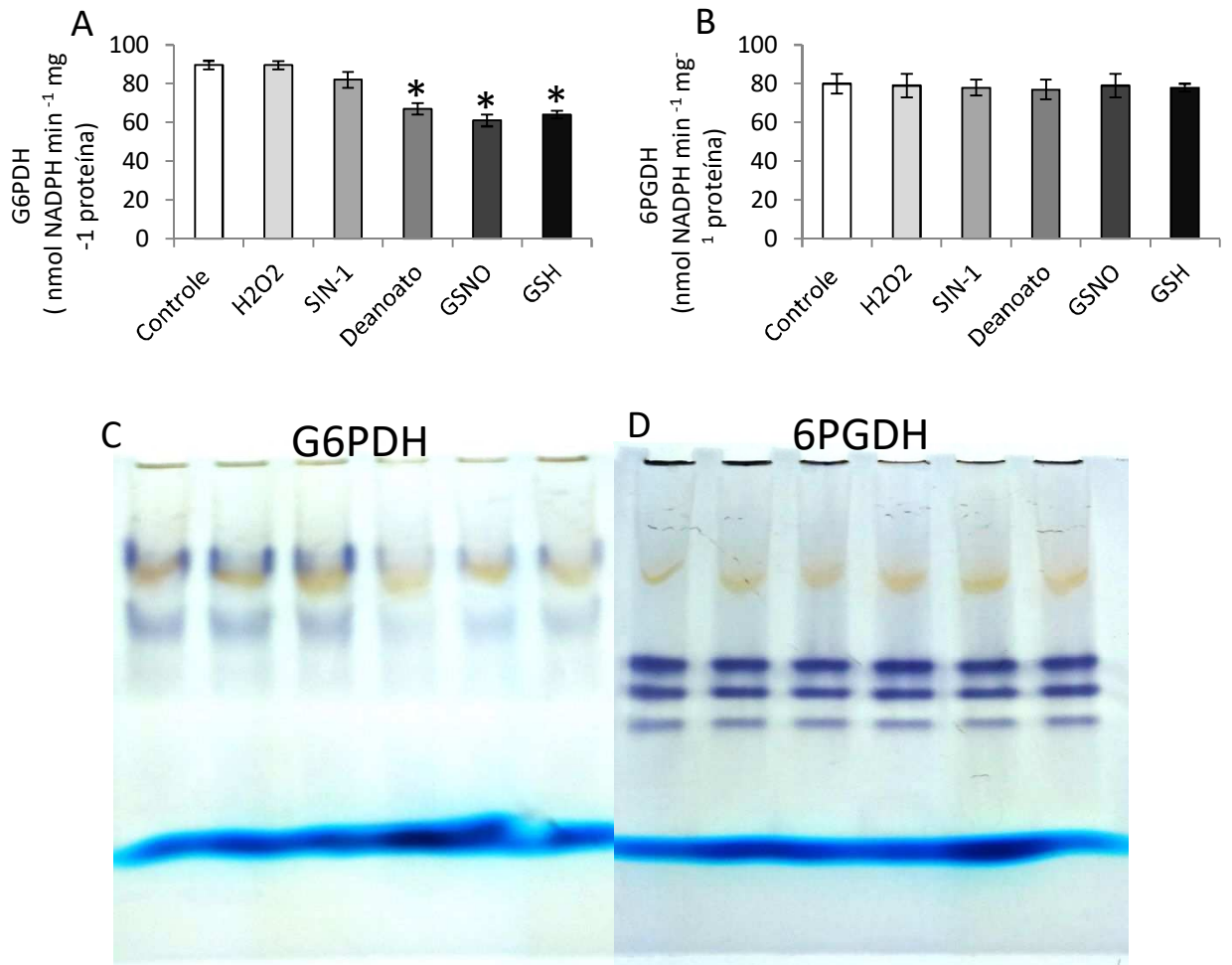


Figura 8: A e C: atividade enzimática de Glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) e B e D: 6 fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) em *A. thaliana* tratada com diferentes poderes redutores e oxidantes. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Os resultados são médias de três experimentos diferentes. * indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

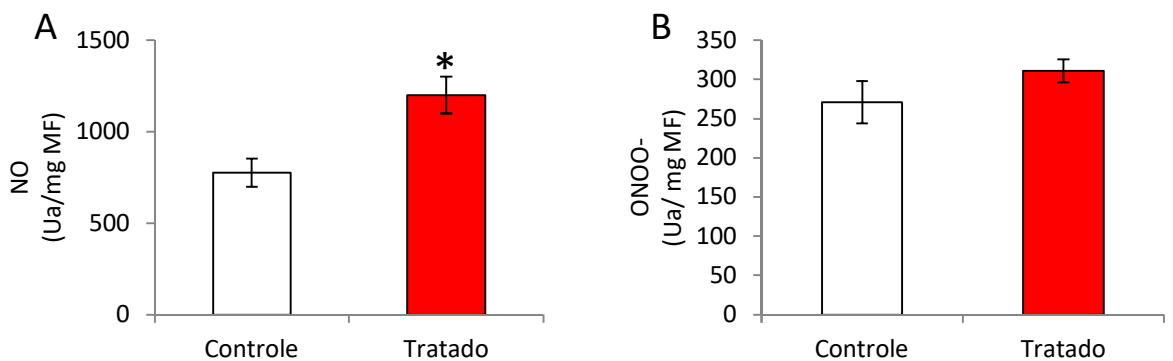


Figura 9: Teor de Oxido Nítrico (NO) e Peroxinitrito (ONOO⁻) em *A. thaliana* exposta ao herbicida glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Os resultados são médias de três experimentos diferentes. * indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. Conclusões Gerais

H. chrysotricus (Ipê amarelo) foi mais sensível quando comparada com *G. gardneriana* (Bacupari). Isso se deve ao fato de a primeira espécie possuir folha com grande densidade de tricomas, característica estrutural que favorece a adsorção do herbicida em sua superfície, aumentando o tempo de contato do órgão com este, potencializando a absorção. Além de um sistema antioxidante enzimático menos eficiente que *G. gardneriana*, uma vez que menor atividade de quatro das cinco enzimas analisadas neste trabalho foi encontrada nesta espécie.

A ação mais pronunciada do glifosato em *H. chrysotricus* provocou alterações na fotossíntese, fluorescência da clorofila *a*, na peroxidação lipídica e nos teores de ácido chiquímico, revelando que *H. chrysotricus*, quando exposta ao glifosato, desenvolve marcadores indicativos da presença dele no ambiente sendo, portanto, efetiva como biosensora/bioindicadora de áreas impactadas com este herbicida.

Após a exposição de *A. thaliana* ao herbicida glifosato foi possível concluir que ele é capaz de provocar estresse oxidativo, além de induzir também a um aumento na produção de NO. Esta espécie foi capaz de promover ajustes no seu sistema antioxidativo enzimático e não enzimático o qual foi suficiente para garantir a sobrevivência da planta, mesmo com o aparecimento de sintomas visuais como redução de crescimento e murcha das folhas.

As enzimas 6PGDH e G6PDH estão diretamente envolvidas na geração de poder redutor nas plantas sobre estresse, o que manteve funcionamento adequado do ciclo ascorbato-glutationa, sugerindo que estes dois mecanismos sejam cruciais para os processos de detoxificação em *A. thaliana* quando exposta ao herbicida glifosato.